# Aus dem Institut für Pathologie (Prof. Dr. med. P. Ströbel)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Charakterisierung der Immunantwort auf Sentinel-Lymphknoten-Metastasen beim malignen Melanom

#### INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Arne Alexander Baumann

aus

Emden

Göttingen 2022

Prof. Dr. med. W. Brück
Prof. Dr. med. P. Ströbel
Prof. Dr. med. L. Kretschmer
Prof. Dr. med. P. Ströbel
1101. D1. 111cu. 1. 01100ci
Prof. Dr. med. L. Kretschmer
Prof. Dr. med. L. Kretschmer PD Dr. med. dent. S. Sennhenn-Kirchner

ich, die Dissertation Hiermit Titel erkläre mit dem "Charakterisierung der Immunantwort auf Sentinel-Lymphknoten-Metastasen Melanom" beim malignen eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 22.01.2022	
	(Unterschrift)

0 Inhaltsverzeichnis

# Inhaltsverzeichnis

Inhal	ltsverzeichnis	I
Abbi	ldungsverzeichnis	III
Tabe	llenverzeichnis	V
Abkü	irzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
1.1	Inzidenz und Epidemiologie des malignen Melanoms	1
1.2	Klassifikation des malignen Melanoms	2
1.3	Diagnostik und Staging beim malignen Melanom	3
1.4	Therapie und Prognose beim malignen Melanom	7
1.5	Prognostische Wertigkeit des Sentinellymphknotens beim malignen Melanom	10
1.6	Die Bedeutung des Immunsystems beim malignen Melanom	11
1.7 1.7.1 1.7.2	Ausgewähltes Panel zur immunologischen Charakterisierung des malignen Melanoms Immunzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort	11 12
1.7.2	Kostimulatorische Moleküle antigen-präsentierender Zellen	
1.7.4	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	
1.7.5	Indolamin-2,3-Dioxygenase	15
1.8	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Patienten	17
2.2	Immunhistochemie	17
2.3	Auswertung der immunhistochemischen Präparate	22
2.3.1	Tumorassoziation	22
2.3.2	Tumorinfiltration	
2.3.3	Zellanzahl	
2.4	Kohorten-Einteilung	
2.4.1 2.4.2	Kohorte I: "in-situ-Metastasen", sehr gute Prognose	
2.4.3	Kohorte III: geringe Tumorlast, schlechte Prognose	
2.4.4	Kohorte IV: hohe Tumorlast, gute Prognose	
2.5	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Patientenkollektiv	28
3.2	Immunzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort	30
3 2 1	CD8	30

0 Inhaltsverzeichnis

6	Literaturverzeichnis	90
5	Zusammenfassung	88
4.6	Beurteilung der wissenschaftlichen Methodik	85
4.5	Indolamin-2,3-Dioxygenase	84
4.4	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	
4.3	Kostimulatorische Moleküle antigen-präsentierender Zellen	82
4.2	TH2-polarisierte T-Helferzellen	80
4.1	Immunzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort	
4	Diskussion	75
3.6.1	IDO	71
3.6	Indolamin 2,3-Dioxygenase	71
3.5.1	iNOS	
3.5	Induzierbare Stickstoffmonooxid-Synthase	67
3.4.2	CD80	
3.4 3.4.1	Kostimulatorische Moleküle antigenpräsentierender Zellen	
3.3.2		
3.3.1	CD4GATA3	
3.3	TH2-polarisierte T-Helferzellen	
3.2.8	Mast Cell Tryptase (MCT)	
3.2.7	CD138	49
3.2.6	CD1a	45
3.2.5	CD68	
3.2.4	CD57	
3.2.2 3.2.3	CD20	

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quantitative Analyse der Zellanzahl	25
Abbildung 2: Färbeergebnis CD8 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	30
Abbildung 3: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI zytotoxischer T-Zellen in den Kohorten II-IV	31
Abbildung 4: TA und TI CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen	31
Abbildung 5: Anteil CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	32
Abbildung 6: Färbeergebnis CD20 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	33
Abbildung 7: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD20-positiver B-Zellen in den Kohorten II-IV	34
Abbildung 8: TA und TI CD20-positiver B-Zellen	34
Abbildung 9: Anteil CD20-positiver B-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	
Abbildung 10: Färbeergebnis CD56 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	36
Abbildung 11: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD56-positiver NK- Zellen in den Kohorten II-IV	37
Abbildung 12: Anteil CD56-positiver NK-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	37
Abbildung 13: Färbeergebnis CD57 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	39
Abbildung 14: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD57-positiver Zellen in den Kohorten II-IV	40
Abbildung 15: TA CD57-positiver Zellen	40
Abbildung 16: Anteil CD57-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	41
Abbildung 17: Färbeergebnis CD68 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	42
Abbildung 18: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD68-positiver Makrophagen in den Kohorten II-IV	43
Abbildung 19: TA und TI CD68-positiver Makrophagen	43
Abbildung 20: Anteil CD68-positiver Makrophagen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	44
Abbildung 21: Färbeergebnis CD1a mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	45
Abbildung 22: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD1a-positiver dendritischer Zellen in den Kohorten II-IV	46
Abbildung 23: Expression von CD1a durch das Tumorgewebe	47
Abbildung 24: Anteil CD1a-positiver dendritischer Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	47
Abbildung 25: Färbeergebnis CD138 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	49
Abbildung 26: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD138-positiver Plasmazellen in den Kohorten II-IV	50
Abbildung 27: TA und TI CD138-positiver Plasmazellen.	50
Abbildung 28: Anteil CD138-positiver Plasmazellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	51
Abbildung 29: Färbeergebnis MCT mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	52
Abbildung 30: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI MCT-positiver  Mastzellen in den Kohorten II-IV	53
Abbildung 31: TI MCT-positiver Mastzellen	53
Abbildung 32: Anteil MCT-positiver Mastzellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I- IV	54
Abbildung 33: Färbeergebnis CD4 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	55

Abbildung 34: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD4-positiver T-Helferzellen in den Kohorten II-IV	56
Abbildung 35: TA und TI CD4-positiver T-Helferzellen	56
Abbildung 36: Anteil CD4-positiver T-Helferzellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	57
Abbildung 37: Färbeergebnis GATA3 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt	58
Abbildung 38: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI GATA3-positiver Zellen in den Kohorten II-IV	59
Abbildung 39: TA und TI GATA3-positiver Zellen	59
Abbildung 40: Anteil GATA3-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	60
Abbildung 41: Färbeergebnis CD40 mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt	61
Abbildung 42: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD40-positiver Zellen in den Kohorten II-IV	62
Abbildung 43: TA und TI CD40-positiver Zellen.	62
Abbildung 44: Anteil CD40-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	63
Abbildung 45: Färbeergebnis CD80 mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt	64
Abbildung 46: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD80-positiver Zellen in den Kohorten II-IV	65
Abbildung 47: TA und TI CD80-positiver Zellen.	65
Abbildung 48: Anteil CD80-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	66
Abbildung 49: Färbeergebnis iNOS mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt	67
Abbildung 50: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI iNOS-positiver Zellen in den Kohorten II-IV	68
Abbildung 51: TA, TI und Expression von iNOS.	69
Abbildung 52: Anteil iNOS-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	69
Abbildung 53: Färbeergebnis IDO mit dem DAKO Autostainer Link 48, <i>hotspot</i> ohne Tumoranschnitt	71
Abbildung 54: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI IDO-positiver Zellen in den Kohorten II-IV	72
Abbildung 55: TA, TI und Epression von IDO	73
Abbildung 56: Anteil IDO-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	73

0 Tabellenverzeichnis V

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Klinisch-histologische Subtypen kutaner maligner Melanome	3
Tabelle 2: T-Klassifikation beim malignen Melanom nach Gershenwald et al. 2017	4
Tabelle 3: N-Klassifikation beim malignen Melanom nach Gershenwald et al. 2017	5
Tabelle 4: M-Klassifikation beim malignen Melanom nach Gershenwald et al. 2017	6
Tabelle 5: Stadieneinteilung beim malignen Melanoms nach Gershenwald et al. 2017	7
Tabelle 6: Initiale Lokalisation der Metastasierung und Überlebensrate bei Patienten mit Stage IV-Melanom nach Barth et al. 1995	9
Tabelle 7: S-Klassifikation nach Starz et al. 2004	11
Tabelle 8: Verwendete Antikörper	19
Tabelle 9: Färbeprotokoll zum Dako Autostainer Link 48	20
Tabelle 10: Färbeprotokoll zum Dako Omnis	20
Tabelle 11: Score der semiquantitativen Auswertung der Tumorassoziation	22
Tabelle 12: Score der semiquantitativen Auswertung der Tumorinfiltration	23
Tabelle 13: Klinisch-pathologische Faktoren des Patientenkollektivs	29
Tabelle 14: Protokoll des Färbeergebnisses CD8	30
Tabelle 15: Mittelwert und Median des Anteils zytotoxischer T-Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	32
Tabelle 16: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD8	32
Tabelle 17: Protokoll des Färbeergebnisses CD20	33
Tabelle 18: Mittelwert und Median des Anteils CD20-positiver B-Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	35
Tabelle 19: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD20	35
Tabelle 20: Protokoll des Färbeergebnisses CD56	36
Tabelle 21: Mittelwert und Median des Anteils CD56-positiver NK-Zellen an der Gesamt- Immunzellanzahl in den Kohorten I-IV	38
Tabelle 22: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD56	38
Tabelle 23: Protokoll des Färbeergebnisses CD57	39
Tabelle 24: Mittelwert und Median des Anteils CD57-positiver Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	41
Tabelle 25: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD57	41
Tabelle 26: Protokoll des Färbeergebnisses CD68	42
Tabelle 27: Mittelwert und Median des Anteils CD68-positiver Makrophagen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	44
Tabelle 28: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD68	44
Tabelle 29: Protokoll des Färbeergebnisses CD1a	45
Tabelle 30: Mittelwert und Median des Anteils CD1a-positiver dendritischer Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	48
Tabelle 31: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD1a	48
Tabelle 32: Protokoll des Färbeergebnisses CD138	49
Tabelle 33: Mittelwert und Median des Anteils CD138-positiver Plasmazellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	51
Tabelle 34: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD138	51
Tabelle 35: Protokoll des Färbeergebnisses MCT	52
Tabelle 36: Mittelwert und Median des Anteils MCT-positiver Mastzellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	54
Tabelle 37: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von MCT	54

0 Tabellenverzeichnis VI

Tabelle 38: Protokoll des Färbeergebnisses CD4	. 55
Tabelle 39: Mittelwert und Median des Anteils CD4-positiver T-Helferzellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	57
Tabelle 40: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD4	. 57
Tabelle 41: Protokoll des Färbeergebnisses GATA3	. 58
Tabelle 42: Mittelwert und Median des Anteils GATA3-positiver Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	60
Tabelle 43: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von GATA3	60
Tabelle 44: Protokoll des Färbeergebnisses CD40	61
Tabelle 45: Mittelwert und Median des Anteils CD40-positiver Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	63
Tabelle 46: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD40	. 63
Tabelle 47: Protokoll des Färbeergebnisses CD80	. 64
Tabelle 48: Mittelwert und Median des Anteils CD80-positiver Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	66
Tabelle 49: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD80	66
Tabelle 50: Protokoll des Färbeergebnisses iNOS	67
Tabelle 51: Mittelwert und Median des Anteils iNOS-positiver Zellen an der Gesamt- Zellanzahl in den Kohorten I-IV	70
Tabelle 52: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von iNOS	70
Tabelle 53: Protokoll des Färbeergebnisses IDO	71
Tabelle 54: Mittelwert und Median des Anteils IDO-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV	74
Tabelle 55: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von IDO	74

VII

# Abkürzungsverzeichnis

ALM Akrolentiginöses Melanom
LDH Laktatdehydrogenase
CD cluster of differentiation
DZ Dendritische Zellen

FFPE Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

IDO Indolamin-2,3-Dioxygenase

iNOS Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

LMM Lentigo-maligna-Melanom MUP melanoma of unknown primary NK-Zellen Natürliche Killerzellen NM Noduläres Melanom

NSLK Nicht-Sentinel-Lymphknoten

SLK Sentinel-Lymphknoten

SSM Superfiziell-spreitendes Melanom

TA Tumorassoziation
TI Tumorinfiltration

ZTL Zytotoxischer T-Lymphozyt

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

# 1 Einleitung

Das maligne Melanom ist ein hochgradig invasiv-maligner Tumor, der von den Melanozyten als den pigmentbildenden Zellen der Haut ausgeht. Die zu einem malignen Melanom mutierten Pigmentzellen machen etwa 1-2 % der epidermalen Hautzellen aus und sind dabei zumeist im *Stratum basale* der Haut lokalisiert. Sie finden sich aber auch in der Schleimhaut, der Konjunktiva und Uvea der Augen oder den Meningen. Melanozyten sind Wanderzellen, die während der Ontogenese von der Neuralleiste zu den Orten wandern, in denen Melanin gebildet wird. Sie wachsen dabei nicht im Verbund als Gewebe und bilden keine zwischenzelligen Kontaktstrukturen. Entartete Tumorzellen dieser Entität behalten diese biologischen Eigenschaften, womit man die für das Melanom charakteristische frühzeitige lymphogene Einschwemmung erklären könnte (Plewig und Braun-Falco 2015). Bei der Tumorbildung und Metastasierung behalten die Melanomzellen in der Regel auch ihre starke Pigmentierung, es sind allerdings auch amelanotische Tumore bekannt (Garbe et al. 2007).

Das maligne Melanom gilt als hochaggressiv, was maßgeblich nicht auf die lokale Invasivität zurückzuführen ist, sondern auf die oft frühzeitige und starke hämato- und lymphogene Metastasierung selbst bei kleinen Tumoren.

# 1.1 Inzidenz und Epidemiologie des malignen Melanoms

Die weltweite Inzidenz des malignen Melanoms ist in den vergangenen Dekaden stark gestiegen und erhöht sich stärker als bei allen anderen Krebsarten (Ali et al. 2013). 2018 erkrankten etwa 280.000 Menschen am malignen Melanom, wodurch es weltweit auf Rang 19 im Ranking der Neuerkrankungen aller Krebsentitäten liegt. Die weltweite Inzidenz liegt bei etwa 2,8-3,1 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner jährlich, sie variiert dabei aber stark zwischen den Ländern: So lag sie 2018 in Australien bei 33,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, während Länder Südostasiens und Afrikas weniger als 0,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Bewohner verzeichneten.

In Deutschland lag die Inzidenz 2018 bei 21,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Damit lag diese Krebserkrankung auf Rang 6 der häufigsten Tumorentitäten in Deutschland (Bray et al. 2020). Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Das mittlere Erkrankungsalter bei Männern liegt bei 67 Jahren und bei Frauen bei 60 Jahren. Bei keinem anderen soliden Tumor werden ähnlich hohe Anstiege der Inzidenz beschrieben (Robert Koch Institut 2017). Für die nächste Dekade wird weiterhin eine steigende Inzidenz für Europa prognostiziert (Whiteman et al. 2016).

Für die hohe Inzidenz in Deutschland gibt es unterschiedliche Gründe. So haben etwa die Pigmentierung bzw. der Hauttyp einen signifikanten Einfluss. Die Mehrheit der Bevölkerung

in Deutschland ist hellhäutig. Ein hellhäutiger Mensch reagiert sensitiver auf UV-Strahlung als ein dunkelhäutiger Mensch und hat damit ein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken (Rees 2003). Außerdem erhöht sich die Exposition der Bevölkerung gegenüber UV-Licht. Ein über die Jahre verändertes Risikoverhalten in der Freizeit und im Urlaub, eine Verschiebung des Schönheitsideals hin zu einem sonnengebräunten Hautteint, aber auch Veränderungen des Klimas spielen hier eine zentrale Rolle (Bentham und Aase 1996). Die Mehrheit der Melanome entsteht auf sporadisch exponierten Stellen wie Rücken oder Waden. Deshalb kann man annehmen, dass nicht die Dauer der Exposition, sondern eher die Intensität der entscheidende Risikofaktor ist. Im besonderen Maße erhöht sich das Risiko einer Erkrankung bei häufiger vorkommenden Sonnenbränden im Kindes- und Jugendalter (Nelemans et al. 1993). Unabhängig vom Phänotyp und der Ethnie werden auch weitere genetische Faktoren diskutiert, wie zum Beispiel eine erhöhte Anzahl von Naevi (Garbe et al. 1994; Gandini et al. 2005). Darüber hinaus kann man feststellen, dass die Inzidenz für Tumore mit geringer Tumordicke stark zunimmt, während die Inzidenz für Tumore mit hoher Tumordicke stagniert oder nur leicht ansteigt. Dies ist auf ein besseres Screening und eine verbesserte Aufklärung zurückzuführen (Lipsker et al. 2007).

### 1.2 Klassifikation des malignen Melanoms

Das maligne Melanom lässt sich in vier Subtypen und weitere Unterformen einteilen (siehe Tabelle 1). Bei der Klassifizierung handelt es sich vorwiegend um eine Einteilung anhand des Wachstumsverhaltens und histologischer Parameter, wie etwa der Verteilung der Melanozyten in der frühen Wachstumsphase. Dabei weisen das superfiziell spreitende, das Lentigo maligna und das akrolentiginöse Melanom zunächst ein horizontales Wachstum auf, während die noduläre Entität primär vertikal wächst.

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist der am häufigsten vorkommende Subtyp des malignen Melanoms. Das SSM weist ein primär horizontales (radiales) Wachstumsmuster auf, wächst als Makula und entwickelt sich langsam zu einer Plaque, oft mit variierendem Colorit und hellen regressiven Arealen (Garbe et al. 2007). Das SSM geht häufig aus einem dysplastischen Nävus hervor. Histologisch charakteristisch sind zytoplasma-reiche, in Nestern gelegene oder pagetoid verteilte Melanomzellen. Die am häufigsten betroffenen Körperstellen sind die unteren Extremitäten bei Frauen und der obere Rücken bei Männern (Schultz und Schuler 2005).

Das noduläre Melanom (NM) ist das zweithäufigste Melanom. Es weist eine hohe Aggressivität und bereits in der frühen Entstehung ein knotiges vertikales Wachstumsmuster auf, sodass die Prognose meist schlechter ist als beim SSM oder LMM. Meist hat diese Unterform eine homogene schwarze Farbe, sie kann allerdings bei der amelanotischen Form auch hautfarben oder rötlich sein (Schultz und Schuler 2005). Wegen der vertikalen Wachstumsrichtung kommt es zu einer frühzeitigen Metastasierung.

Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) ist eine häufig im Gesicht auftretende Unterform. Das LMM entwickelt sich dabei aus einer Lentigo maligna, was einem Melanoma in situ entspricht. In der frühen Wachstumsphase zeigt sich ein radiales Wachstum. Dabei kann die Lentigo maligna über Jahre bis Jahrzehnte als dunkles Pigmentmal imponieren, bevor es zu invasivem Wachstum und Ulzeration kommt (Schultz und Schuler 2005).

Das akrolentiginöse Melanom (ALM) tritt vorwiegend palmar oder plantar auf, kann aber auch sub- oder periungual vorkommen. Klinisch ähnelt es dem LMM.

Zu den Subformen zählen das Schleimhautmelanom, aber auch das Netzhautmelanom und das Hirnhautmelanom.

Tabelle 1: Klinisch-histologische Subtypen kutaner maligner Melanome im deutschsprachigen Raum (n = 30015) nach Daten des Zentralregisters malignes Melanom (Garbe et al. 1995)

Тур	Abkürzung	Anteil (%)
Superfiziell spreitendes Melanom	SSM	57,4
Noduläres Melanom	NM	21,4
Lentigo-maligna-Melanom	LMM	8,8
Akrolentiginöses Melanom	ALM	4,0
Nicht klassifizierbares Melanom	UCM	3,5

#### 1.3 Diagnostik und Staging beim malignen Melanom

Die klinische Diagnostik beinhaltet ein ausführliches Anamnesegespräch mit einem Fokus auf Risikofaktoren, Befundbeschreibung und den zeitlichen Verlauf. Außerdem wird eine Ganzkörperinspektion durchgeführt. Bei Patienten mit einer hohen Anzahl an Naevi kann eine wiederholte Ganzkörperfotografie von Vorteil sein, um Veränderungen der Haut leichter erkennen zu können. Um klinisch zu bestimmen, ob es sich um eine maligne Läsion handelt, kann man die ABCDE-Regel verwenden. Die **ABCDE**-Regel umfasst die Kriterien **A**symmetrie, irreguläre **B**egrenzung, unterschiedliche Farbtöne (**C**olorit), **D**urchmesser > 0,5 cm, sowie eine Zunahme der **E**rhabenheit. Ergänzend können verdächtige Läsionen dermatoskopisch mit dem Auflichtmikroskop untersucht werden. Dabei können bei zehnfacher Vergrößerung Strukturen von der Epidermis bis zur papillären Dermis betrachtet werden (Pehamberger et al. 1987). Wenn zwei oder mehr der oben genannten Kriterien zutreffen, dann festigt sich der Verdacht eines malignen Prozesses, sodass die Exzision und eine histologische Untersuchung der Hautveränderung empfohlen werden. Dabei sollte die Läsion *in toto* entfernt und auch das umgebende Weichgewebe sollte histologisch begutachtet werden.

Das Staging des malignen Melanoms erfolgt nach den Kriterien des AJCC (American Joint Committee on Cancer), das 2017 eine überarbeitete TNM-Klassifikation veröffentlicht hat (Gershenwald et al. 2017). Dabei wird das Melanom anhand verschiedener histologischer Parameter klassifiziert und prognostisch eingeordnet. Für die Klassifikation relevante Parameter sind die Dicke des Primärtumors, die Ulzeration, das Vorhandensein und Ausmaß der Metastasierung in die regionären Lymphknoten, das Vorhandensein von Mikrosatellit-, Satellit- oder In-Transit-Metastasen (Stage III) und das Vorhandensein und die Lokalisation von Fernmetastasen zusammen mit dem Blutserumwert der Lactatdehydrogenase (Stage IV).

Beim Staging erfolgt zunächst die pathohistologische Einordnung des Tumors, also die T-Klassifikation. Die Tumordicke nach Breslow wird histologisch mit einem okularen Mikrometer bestimmt und bezeichnet die Invasionsstrecke, die die Tumorzellen zurückgelegt haben. Sie umfasst die Strecke vom *Stratum granulosum* bis zur tiefsten Invasion in Millimeter (Hengge und Ruzicka 2006). Die Ulzeration des Primärtumors wird durch die vom Tumorwachstum unterbrochene Epidermis und die damit assoziierte entzündliche Reaktion bestimmt. Die Ermittlung des Clark-Levels, einer weiteren Charakterisierung der Eindringtiefe, ist für die aktuelle Einteilung nach AJCC nicht mehr relevant (Pflugfelder et al. 2013). Auch die Mitoserate, die als die Anzahl der Mitosen pro mm² im invasiven Anteil des Tumors definiert wird und von 2009 bis 2017 in die TNM-Klassifikation einbezogen wurde, wird in der aktuellen Version des AJCC nicht mehr zur Einordnung verwendet. Die T-Klassifikation beim Melanom wird in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: T-Klassifikation beim malignen Melanom nach Gershenwald et al. 2017

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostisch relevante Parameter
	(nach Breslow)	
$T_{IS}$		Melanoma in-situ, keine Tumorinvasion
$T_{\mathrm{X}}$	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar
$T_1$	a: ≤ 0,8 mm	ohne Ulzeration
	b: ≤ 0,8 mm	mit Ulzeration
	> 0,8-1,0 mm	mit/ohne Ulzeration
$T_2$	a: > 1,0-2,0 mm	ohne Ulzeration
	b: > 1,0-2,0 mm	mit Ulzeration
$T_3$	a: > 2,0-4,0 mm	ohne Ulzeration
	b: > 2,0-4,0 mm	mit Ulzeration
$T_4$	a:>4,0 mm	ohne Ulzeration
	b: > 4,0 mm	mit Ulzeration

Bei einer T-Klassifikation T<sub>1b</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> oder T<sub>4</sub> sollte eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie als weitere Staging-Maßnahme durchgeführt werden (Gershenwald et al. 1999). Der Sentinel-Lymphknoten (SLK), der auch als Wächterlymphknoten bezeichnet wird, ist der drainierende Lymphknoten einer mit einem malignen Melanom erkrankten Hautregion. Zur Detektion des SLK wird eine radioaktive Tracersubstanz in die Umgebung der Exzisionsstelle injiziert und mit einer Gammakamera verfolgt. Nach der Anreicherung im SLK kann der Lymphknoten markiert und dann durch einen Chirurgen entfernt werden (Morton et al. 1992). Die histologische Aufarbeitung des SLK erfolgt durch eine HE-Färbung und eine immunhistochemische Färbung, wobei hier die gebräuchlichsten Marker HMB45, S100B und MelanA/MART-1 sind. Bei einem positiven Befund wird die Beteiligung aller regionären Lymphknoten ermittelt und klassifiziert, wie es in Tabelle 3 dargestellt wird. Im Rahmen der N-Klassifikation wird zwischen klinisch okkulten und klinisch detektierten Lymphknoten unterschieden. Erstere sind klinisch unauffällig und können nur histologisch durch die Biopsie diagnostiziert werden. Letztere lassen sich durch klinische, röntgenologische oder sonografische Verfahren diagnostizieren. Dennoch wird auch in diesen Fällen meist eine Biopsie durchgeführt.

Tabelle 3: N-Klassifikation beim malignen Melanom nach Gershenwald et al. 2017

N- Klassifikation	Zahl metastatisch befallener Lymphknoten (LK)	Ausmaß der Lymphknoten-Metastasierung	In-transit-, Satellit- oder Mikrosatellit- metastase(n)
$N_X$	LK nicht befundet		nein
$N_0$	Keine LK betroffen		nein
$N_1$	a: ein LK	mikroskopisch, klinisch okkult (SLK-Biopsie)	nein
	b: ein LK	makroskopisch, klinisch detektiert	nein
	c: kein LK	/	ja
$N_2$	a: zwei oder drei LK	mikroskopisch, klinisch okkult (SLK-Biopsie)	nein
	b: zwei oder drei LK	mind. ein LK makroskopisch, klinisch detektiert	nein
	c: ein LK	mikroskopisch oder makroskopisch	ja
$N_3$	a: vier LK oder mehr	mikroskopisch, klinisch okkult (SLK-Biopsie)	nein
	b: vier LK oder mehr	mind. ein LK makroskopisch, klinisch detektiert	nein
	c: zwei LK oder mehr	mikroskopisch oder makroskopisch	ja

Zum Ausschluss von Fernmetastasen sollten eine Röntgenuntersuchung des Thorax und eine Sonographie des Abdomens durchgeführt werden. Auch CT- oder PET-Untersuchungen des Thorax und des Abdomens, Knochenszintigraphie und MRT- oder CT-Aufnahmen des Gehirns sind bei einem hohen Metastasierungspotenzial adäquate diagnostische Optionen. Laborchemisch können im Blutserum die Tumormarker-Proteine S-100β und MIA bestimmt werden. Des Weiteren sollten für eine prognostischen Einschätzung die Blutserumwerte der Lactatdehydrogenase (LDH) und des C-reaktiven Proteins (CRP) bestimmt werden (Plewig und Braun-Falco 2015). Für die M-Klassifikation relevant sind das Vorhandensein von Metastasen, deren Lokalisation und der LDH-Wert im Blutserum, wie es in Tabelle 4 dargestellt wird.

Tabelle 4: M-Klassifikation beim malignen Melanom nach Gershenwald et al. 2017

M-Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
$\mathbf{M}_0$	Keine Fernmetastasen	/
$M_{1a}$	0: Metastasen in Haut, Weichgewebe oder nicht-regionalen Lymphknoten	normal
	1: Metastasen in Haut, Weichgewebe oder nicht-regionalen Lymphknoten	erhöht
$\mathrm{M}_{1\mathrm{b}}$	0: Lungenmetastase(n) mit oder ohne Beteiligung $\mathrm{M}_{1a}$	normal
	1: Lungenmetastase(n) mit oder ohne Beteiligung $\mathrm{M}_{1a}$	erhöht
$\mathrm{M}_{1c}$	0: Fernmetastase(n) anderer Lokalisation außer ZNS mit oder ohne Beteiligung $M_{\rm 1a}$ oder $M_{\rm 1b}$	normal
	1: Fernmetastase(n) anderer Lokalisation außer ZNS mit oder ohne Beteiligung $M_{\rm 1a}$ oder $M_{\rm 1b}$	erhöht
${ m M}_{1d}$	0: Fernmetastase(n) im ZNS mit oder ohne Beteiligung $M_{1a}$ , $M_{1b}$ oder $M_{1c}$	normal
	1: Fernmetastase(n) im ZNS mit oder ohne Beteiligung $M_{\text{1a}}$ , $M_{\text{1b}}$ oder $M_{\text{1c}}$	erhöht

Anhand der TNM-Klassifikation erfolgt die klinische Stadieneinteilung des Melanoms. Die unterschiedlichen Stadien werden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach Gershenwald et al. 2017

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknoten- Metastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	T <sub>IS</sub>	$N_0$	$M_0$
IA	$T_{1a}$	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{1b}$	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
IB	$T_{2a}$	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
IIA	$T_{2b}$	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
	Тза	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
IIB	$T_{3b}$	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{4a}$	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
IIC	T <sub>4b</sub>	$N_0$	$\mathbf{M}_0$
IIIA	$T_{1a/b}$ bis $T_{2a}$	$N_{1a}$ , $N_{2a}$	$\mathbf{M}_0$
IIIB	$T_0$	$N_{1b}$ , $N_{1c}$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{1a/b}$ bis $T_{2a}$	$N_{1b/c}$ , $N_{2b}$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{2b}/T_{3a}$	$N_{1a}$ bis $N_{2b}$	$\mathbf{M}_0$
IIIC	$T_0$	$N_{2b}$ , $N_{2c}$ , $N_{3b}$ , $N_{3c}$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{1a}$ bis $T_{3a}$	$N_{2c}$ , $N_{3a}$ , $N_{3b}$ , $N_{3c}$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{3b}/T_{4a}$	$N \ge N_1$	$\mathbf{M}_0$
	$T_{4b}$	N <sub>1a</sub> bis N <sub>2c</sub>	$\mathbf{M}_0$
IIID	$T_{4b}$	$N_{3a/b/c}$	$\mathbf{M}_0$
IV	Alle T, T <sub>IS</sub>	Alle N	$M_1$

# 1.4 Therapie und Prognose beim malignen Melanom

Bei klinischem Verdacht auf ein Melanom sollte die gesamte klinisch sichtbare Läsion mittels Exzisionsbiopsie unter Berücksichtigung eines Sicherheitsrandes von 2 mm bis in das Fettgewebe einzeitig entfernt werden. Nach der histologischen Untersuchung und einer bestätigten Diagnose erfolgt in der Regel eine erneute chirurgische Exzision des bereits biopsierten Gewebes mit adäquatem Sicherheitsabstand und gleichzeitiger SLK-Biopsie.

Der Sicherheitsabstand ist dabei von der Tumordicke abhängig und sollte bei Tumoren unter 2 mm Breslowdicke 1 cm betragen, bei Tumoren über 2 mm Breslowdicke 2 cm. *In-situ*-Melanome werden mit 0,5 mm Sicherheitsabstand entfernt. Die chirurgische Therapie ist die einzige kurative Behandlungsmaßnahme des Melanoms (Testori et al. 2019).

Auch Metastasen sollten vor allem chirurgisch reseziert werden. Wenn das Auftreten der Metastasen nicht mehr chirurgisch kontrollierbar ist, dann kommen verschiedene andere Verfahren zur Anwendung, wie Immuntherapie, gezielte Krebstherapie (targeted therapy), Chemotherapie oder Strahlentherapie. Immuntherapeutisch werden seit einigen Jahren vielversprechende Mittel erprobt. Dazu zählen CTLA4-Inhibitoren (Ipilimumab) oder PDL-1-Blocker, die durch eine Beeinflussung der Immunreaktion bemerkenswerte Auswirkungen auf das Überleben bei Stage III und IV Patienten haben (Hodi et al. 2010; Topalian et al. 2014; Coens et al. 2017). Sogenannte BRAF-Inhibitoren, die durch die Blockade einer Signaltransduktionskaskade die Apoptose von Tumorzellen induzieren können, werden in den letzten Jahren verstärkt in der gezielten Krebstherapie eingesetzt (Hauschild et al. 2012; Sosman et al. 2012). Das seit über 25 Jahren adjuvant verwendete Interferon  $\alpha$  wurde oft kontrovers diskutiert. Metaanalysen zeigen allerdings, dass Interferon α sowohl das deseasefree survival als auch das overall survival signifikant positiv beeinflusst (Mocellin et al. 2010; Ives et al. 2017). Chemotherapeutika wie Dacarbazin zeigen bei etwa 10 % der Patienten Wirkung und sind in der Anwendung drittrangig hinter Immuntherapie und gezielter Krebstherapie (Patel et al. 2011; Garbe et al. 2016). Bei Patienten mit LMM oder regionären und inoperablen Metastasen bzw. palliativ schmerztherapeutisch bei Knochen- oder Hirnmetastasen kann eine Strahlentherapie adjuvant indiziert sein (Testori et al. 2009).

Die histologischen Merkmale des primären Melanoms, wie die Tumordicke, die mitotische Rate und die Ulzeration, sind wichtige Eckdaten für die Prognose. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt bei T1-Melanomen (≤ 1,0 mm Tumordicke) 92 %, während sie bei T2-Patienten (> 1.0-2,0 mm Tumordicke) bei 80 %, bei T3-Patienten (> 2,0-4,0 mm Tumordicke) bei 63 % und bei T4-Patienten (≥ 4,0 mm Tumordicke) bei 50 % liegt (Balch et al. 2009).

Bei einer Ulzeration des Melanoms ist die Überlebensrate signifikant kleiner als bei einem nicht-ulzeriertem Melanom der gleichen T-Klassifikation, aber ähnlich der Überlebensrate der nächsthöheren T-Kategorie (Balch et al. 1980; Balch et al. 2009). Ferner ist die mitotische Rate ein unabhängiger prognostischer Faktor. So liegt das 10-Jahres-Überleben von Stage I/II-Patienten bei einer Mitoserate von > 20 Mitosen/mm² bei 48 %, während sie bei einer Mitoserate von < 1 Mitose/mm² bei 93 % liegt (Thompson et al. 2011). Mikrosatelliten-, Satelliten- und In-transit-Metastasen mindern die Prognose signifikant (León et al. 1991; Read et al. 2015). Wenn das Primärmelanom anatomisch an Rumpf, Kopf oder Nacken entsteht, dann ist die Prognose signifikant schlechter als bei einer Ausprägung an Armen oder Beinen (Callender et al. 2011).

Ein erhöhter LDH-Wert im Serum ist ebenfalls ein unabhängiger und signifikanter prognostischer Faktor bei Stage IV-Patienten (Franzke et al. 1998). Dabei sind die Mechanismen und Quellen des erhöhten LDH-Wertsunbekannt (Balch et al. 2009). Auch das Geschlecht ist ein unabhängiger prognostischer Marker. So haben Männer im Vergleich mit Frauen häufiger Melanome mit einer erhöhten Tumordicke, einer häufigeren Ulzeration und einer prognostisch schlechteren Lokalisation, was sich signifikant auf das Überleben auswirkt (Scoggins et al. 2006). Auch die BRAF-Mutation, die sich im Genom von etwa 50 % der Melanompatienten nachweisen lässt, ist prognostisch ungünstig (Ardekani et al. 2012). Zuletzt sind die Anzahl und der initale Metastasierungsort der Fernmetastasen als prognostische Faktoren zu nennen (siehe Tabelle 6). So macht es einen statistisch signifikanten Unterschied, ob das Melanom primär in die Haut und die Lymphknoten bzw. den GI-Trakt oder in Knochen, Leber oder Gehirn streut. Es ist auch statistisch relevant, ob das Melanom in ein Organ oder in mehrere Organe metastasiert. So liegt die 2-Jahres-Überlebensrate bei der Metastasierung in ein Organ bei 15 %, bei zwei oder drei Organen aber bei 5-7 % (Barth et al. 1995).

Tabelle 6: Initiale Lokalisation der Metastasierung und Überlebensrate bei Patienten mit Stage IV-Melanom nach Barth et al. 1995

Ort der Metastasierung	Anteil in % (n = 1521)	Mediane Überlebensrate (Monate)
Haut, Lymphknoten	18,5	15
Gastro-Intestinal-Trakt	6	11
Lunge	34	8
Knochen	5,5	6
Leber	19	4
Gehirn	17	4
Gesamt	100	7,5

Um eine mögliche Tumorrekurrenz oder die Neuentstehung eines weiteren Melanoms frühzeitig erkennen und therapieren, aber auch dem Patienten psychosozial beistehen zu können, sollten nach der Therapie regelmäßige Kontrollen im Rahmen eines follow-ups erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs ist in den ersten fünf Jahren nach der chirurgischen Entfernung am höchsten. Da das Melanom allerdings oft auch spät metastasiert und das Risiko einer erneuten Hautkrebserkrankung stark erhöht ist,

empfiehlt sich ein follow-up von zwei bis vier Terminen pro Jahr über einen Zeitraum von zehn Jahren.

# 1.5 Prognostische Wertigkeit des Sentinellymphknotens beim malignen Melanom

Die SLK-Biopsie wird selektiv bei Patienten mit  $T_{1b}$ -Melanomen und regulär bei Patienten mit  $T_{2}$ -,  $T_{3}$ - oder  $T_{4}$ - Klassifikation und/oder klinisch okkulten oder detektierten Lymphknoten durchgeführt (Cascinelli et al. 2000; Gershenwald et al. 2017).

Etwa 90 % der Patienten mit malignem Melanom zeigen bei der SLK-Biopsie keine Melanomzellen im Wächterlymphknoten. Wenn bei der immunhistochemischen Auswertung des SLK jedoch bereits eingewanderte und entartete Melanomzellen gefunden werden, dann sollte unter Einbeziehung gewichteter Scores, klinischer und histologischer Risikofaktoren das gesamte Basin im Sinne einer kompletten Lymphknotendissektion entfernt werden.

Der SLK ist neben der Breslow-Dicke von höchster prognostischer Wertigkeit. Denn die histologische Untersuchung hilft dabei, das Risiko einer Beteiligung weiterer Lymphknoten und die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten einzuschätzen. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei negativem SLK bei 90,6 %, während sie bei positivem SLK nur 75,4 % beträgt. Auch die Anzahl positiver SLKs wirkt bei einem positiven Lymphknoten sich mit 81,4 % und bei zwei positiven Lymphknoten mit 39,6 % auf die 5-Jahres-Überlebensrate aus (Cascinelli et al. 2006).

Eine hohe Tumorlast im SLK ist auch ein verlässlicher Indikator für die Beteiligung weiterer NSLKs und damit von hoher prognostischer Wertigkeit (Cochran et al. 2004). Um das Stadium des Melanoms im SLK genauer bestimmen zu können, führte eine Arbeitsgruppe um Starz 2004 die aktualisierte S-Klassifikation ein, welche die Eindringtiefe des Melanoms in das Lymphknotenparenchym beschreibt (siehe Tabelle 7). Sie konnte zeigen, dass eine hohe Invasionstiefe des Tumors signifikant die Wahrscheinlichkeit einer NSLK-Beteiligung erhöht. So liegt das Risiko einer NSLK-Beteiligung bei SI und SII bei unter 15 %, während es bei SIII bei über 50 % liegt (Starz et al. 2004). Auch die mikroanatomische Lage der Metastase ist prognostisch relevant. So konnten Dewar et al. nachweisen, dass eine peripher im Lymphknoten gelegene Metastase prognostisch günstiger ist (Dewar et al. 2004).

Weiterhin sind Lymphangiosis und die Ansammlung von Tumorzellen in Lymphgefäßen von prognostischer Relevanz (Starz et al. 2001; Satzger et al. 2007; Satzger et al. 2008).

Tabelle 7: S-Klassifikation nach Starz et al. 2004

Klasse	Definition
S0	Keine infiltrierten Tumorzellen im SLK
SI	Subkapsuläre Tumorzellen, Invasionstiefe < 0,3 mm
SII	Invasionstiefe 0,3-1 mm
SIII	Invasionstiefe > 1 mm

## 1.6 Die Bedeutung des Immunsystems beim malignen Melanom

Das Immunsystem schützt den Körper vor eindringenden Pathogenen, aber auch vor transformierten körpereigenen Zellen, wie Krebszellen. Das Melanom ist ein immunogener durch verschiedene Faktoren untermauert wird. Tumor, was So immunhistochemische Studien die Existenz von Immunzellen, die in das Tumorgewebe infiltrieren, was zu einer günstigeren Prognose führt (Clemente et al. 1996; Taylor et al. 2007). Auch an Fallbeispielen über Spontanregressionen wird deutlich, dass eine intensive Auseinandersetzung zwischen dem Tumor und dem Immunsystem stattfindet, wobei man annehmen kann, dass die Dunkelziffer solcher Regressionen weitaus höher liegt (Kalialis et al. 2009). Hinzu kommt der Nachweis verschiedener tumorassoziierter Antigene und der damit verbundenen T-Zell-Reaktionen (Vujanovic und Butterfield 2007). Außerdem ist das Risiko eines Melanoms bei immunsupprimierten Menschen deutlich höher als bei immunologisch Gesunden (Penn 1993; Stewart et al. 1995). Schließlich spricht auch die im Vorfeld bereits beschriebene Etablierung der Immuntherapien für eine Immunogenität des Melanoms.

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression und -suppression. Das genaue Verständnis der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem könnte daher eine Grundlage für weitere innovative Therapieoptionen liefern.

# 1.7 Ausgewähltes Panel zur immunologischen Charakterisierung des malignen Melanoms

Um die immunologische Reaktion des SLK auf das maligne Melanom immunhistochemisch zu untersuchen und zu charakterisieren, wurde ein Antikörper-Panel etabliert, der diejenigen Zellpopulationen ins Auge fasst, die eine zentrale Rolle in der Immunabwehr einnehmen und prognostisch bedeutsam sein könnten.

#### 1.7.1 Immunzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort

#### 1.7.1.1 CD8

CD8 ist ein transmembranöses Glykoprotein und ein aus einer α- und β-Kette bestehendes Dimer (Norment und Littman 1988). CD8 bindet als Corezeptor des T-Zell-Rezeptors (TCR) an den Peptid:MHC-Klasse-I-Komplex, was zur Aktivierung und Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen führt (O'Rourke und Mescher 1993). Ferner induziert CD8 die Freisetzung und Aktivierung bestimmter Zytokine (Gibbings et al. 2007). In der immunhistochemischen Analyse des Lymphknotens wurde CD8 für den spezifischen Nachweis von zytotoxischen T-Zellen verwendet (Moebius et al. 1991; Germain 2002; Gibbings et al. 2007).

#### 1.7.1.2 CD20

CD20 ist ein Typ III integrales Phosphoprotein, das von B-Zell-Vorläufern und reifen B-Zellen exprimiert wird, sich allerdings bei der Reifung zur Plasmazelle verliert (Tedder und Engel 1994; Teeling et al. 2006). CD20 übernimmt eine regulatorische Funktion beim transmembranösen Calcium-Transport und steuert auf diese Weise Zellwachstum (Kanzaki et al. 1995) und Differenzierung der B-Zelle (Golay et al. 1985; Tedder und Engel 1994; Marshall et al. 2017).

#### 1.7.1.3 CD56

CD56 ist ein membranöses Glykoprotein und dient als Marker für NK-Zellen (Lanier et al. 1989). Auch die Expression auf  $\alpha\beta$ -T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, aktivierten zytotoxischen T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen (DZ) konnte nachgewiesen werden (Kelly-Rogers et al. 2006; Roothans et al. 2013; Van Acker et al. 2016; Acker et al. 2017). Die Funktion von CD56 ist bisher ungeklärt. Weil CD56 ein Oberflächenprotein aus der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle ist, wurde die Hypothese formuliert, dass es eine Rolle bei der Adhäsion von Lymphozyten spielen könnte. Spätere Studien konnten allerdings zeigen, dass CD56 nicht für die zytotoxische Wirkung auf die Zielzelle benötigt wird (Lanier et al. 1989; Lanier et al. 1991).

#### 1.7.1.4 CD57

CD57 ist ein terminal sulfatiertes und kohlenhydratisches Epitop, das vorwiegend von NK-Zellen und T-Zellen exprimiert wird (Abo und Balch 1981; Kared et al. 2016). CD57 exprimierende T-Zellen sind seneszent und nicht mehr fähig zur Proliferation (Brenchley et al. 2003; Wood et al.). Die Expression von CD57 auf NK-Zellen gilt ebenfalls als ein Reifungsmerkmal. CD57 wird nur von Zellen exprimiert, die final entwickelt sind und eine hohe Zytotoxizität aufweisen (Nielsen et al. 2013).

Die Funktion von CD57 ist noch nicht vollends geklärt, es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD57 und der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen nachgewiesen werden (Van den Hove et al. 1998).

#### 1.7.1.5 CD68

CD68 ist ein stark glykolysiertes transmembranöses Typ I Glykoprotein, das endosomallysosomal assoziiert vorliegt (Holness und Simmons 1993). CD68 dient als spezifischer Marker für Makrophagen (Betjes et al. 1991), aber auch für andere Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Greaves und Gordon 2002). Die Funktion von CD68 ist noch nicht genau belegt, aber das Vorkommen auf reifen Endosomen lässt eine Mitwirkung beim Peptid-Transport und bei der Antigen-Prozessierung vermuten (Barois et al. 2002).

#### 1.7.1.6 CD1a

CD1a ist ein integrales Typ I Glykoprotein, das eine strukturelle Ähnlichkeit zum MHC-I-Komplex aufweist. CD1a wird von dendritischen Zellen, auch Langerhanszellen, und von unreifen Thymozyten exprimiert (Coventry und Heinzel 2004; Kaczmarek et al. 2017). Funktionell dient CD1a als antigen-präsentierendes Molekül für die Bindung von lipidischen und glykolipidischen Antigenen an T-Zellen (Sieling 2000; Coventry und Heinzel 2004).

#### 1.7.1.7 CD138

CD138 ist ein Typ I transmembranöses Oberflächen-Proteoglykan aus der Familie der Syndecane (Carey 1997), das von Plasmazellen exprimiert wird (Wijdenes et al. 1996). Auch reife Epithelzellen exprimieren CD138 (O'Connell et al. 2004). Im lymphatischen Gewebe sorgt CD138 für die Einlagerung der B-Zellen in die interstitielle Matrix. Es dient als extrazellulärer Matrix-Rezeptor und partizipiert damit an der Zellproliferation, Zellmigration, Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Interaktion und der Morphogenese (Elenius et al. 1990; Gharbaran 2015).

#### 1.7.1.8 MCT

MCT, mast cell tryptase, ist eine Protease und der am reichlichsten vorhandene Mediator in den Granula von Mastzellen. Es dient als immunhistochemischer Marker ebendieser (Vanderslice et al. 1990). Die biologische Funktion von MCT ist noch nicht vollends aufgeklärt, aber eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen und allergischen Reaktionen ist bekannt (Payne und Kam 2004).

#### 1.7.2 TH2-polarisierte T-Helferzellen

#### 1.7.2.1 CD4

CD4 ist ein Typ I transmembranöses Glykoprotein, das von T-Helferzellen (sowohl TH-1-als auch TH-2-Zellen) und Thymozyten exprimiert wird (Ellmeier et al. 2013; Maddon et al. 1985). Weitere CD4-exprimierende Zellen sind dendritische Zellen (Patterson et al. 1995), NK-Zellen (Bernstein et al. 2006), Makrophagen, Monozyten (Kazazi et al. 1989) sowie Neutrophile (Biswas et al. 2003) und Eosinophile (Lucey et al. 1989). Bei der Aktivierung bindet CD4 als Corezeptor des T-Zell-Rezeptors (TCR) an den Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex, was zur Aktivierung und Differenzierung von TH-Zellen führt (Gay et al. 1987; Wu et al. 1997). Ferner moduliert CD4 die Sekretion von Zytokinen und die Migration von NK-Zellen (Bernstein et al. 2006).

#### 1.7.2.2 GATA3

GATA3 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Bildung von TH-2-Zellen benötigt wird (Patient und McGhee 2002). Er ist sowohl essenziell für die Bildung aus Thymozyten als auch für die Regulierung der Differenzierung aus reifen CD4+ T-Zellen (Ho et al. 2009). Außerdem hemmt er die Differenzierung zu TH-1-Zellen (Yagi et al. 2011). TH-2-Zellen induzieren den Isotopenwechsel von B-Zellen.

#### 1.7.3 Kostimulatorische Moleküle antigen-präsentierender Zellen

#### 1.7.3.1 CD40

CD40 ist ein kostimulatorisches transmembranöses Typ I Protein (Kooten und Banchereau 2000). Vorwiegend exprimierende Zellen sind antigen-präsentierende Zellen, wie B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen, aber auch eosinophile und basophile Granulozyten, epitheliale und endotheliale Zellen sowie Keratinozyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Banchereau et al. 1995; Kooten und Banchereau 1997; U.Schönbeck und Libby 2001). Die Funktion des Rezeptors bezieht sich auf die Formierung von Keimzentren, den Istopenwechsel bei B-Zellen, die durch T-Zellen vermittelte Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen, die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen sowie die Steigerung der B-Zell-Proliferationsrate (Foy et al. 1993; Danese et al. 2004).

#### 1.7.3.2 CD80

CD80 ist ein Typ I transmembranöses Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie und wird auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (Freeman et al. 1989). CD80 kann die Bindung mit CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen eingehen, wobei eine kostimulatorische (CD28) oder inhibitorische (CTLA-4) Wirkung auf die Immunabwehr generiert wird, sofern der TCR bereits die Bindung mit einem stimulierenden Antigen eingegangen ist (Pardoll 2012).

#### 1.7.4 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

#### 1.7.4.1 iNOS

Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase ist ein Enzym, das die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) katalysiert. iNOS kann von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Die Induktion erfolgt durch Zytokine, wobei das dabei freiwerdende NO immunsupprimierend wirken kann (Xue et al. 2018).

#### 1.7.5 Indolamin-2,3-Dioxygenase

#### 1.7.5.1 IDO

Indolamin-2,3-Dioxygenase, das kurz auch als IDO bezeichnet wird, ist ein intrazelluläres Enzym, das den Katabolismus von Tryptophan zu Kynurenin und anderen Derivaten einleitet (Taylor und Feng 1991). Die Expression von IDO wurde schon in verschiedenen Immunzellen und Stromazellen nachgewiesen, konnte jedoch am besten für dendritische Zellen charakterisiert werden (Munn et al. 2002). IDO fungiert als Regulator für die adaptive Immunantwort und trägt deshalb auch zur tumorprotektiven Immunsuppression bei (Johnson und Munn 2012; Chevolet et al. 2015). Außerdem kann es durch die Kynurenin-Entstehung bei Makrophagen und dendritischen Zellen die Ausrichtung auf einen immunsuppressiven Phänotyp einleiten (Jaronen und Quintana 2014; Munn und Mellor 2016). Schließlich induziert IDO auch die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Munn und Mellor 2016).

# 1.8 Fragestellung

Das maligne Melanom ist ein immunogener Tumor, der in den meisten Fällen eine körpereigene Abwehrreaktion auslöst. Weil der Körper eigenständig dazu in der Lage zu sein scheint, diese Krebserkrankung zumindest teilweise adäquat zu bekämpfen, versucht die Wissenschaft, diesen Prozess aufzuklären und im Hinblick auf therapeutische Anwendungen auszunutzen. Allerdings hat man die Reaktion auf den Tumor wegen der komplexen immunologischen Vorgänge bisher noch nicht verstanden.

Um zu einem besseren Verständnis der immunologischen Prozesse zu gelangen, wurden in der vorliegenden Arbeit Metastasen des Melanoms in SLK, als sekundäres lymphatisches Organ Epizentrum der Immunantwort, untersucht. Anhand eines umfangreichen Antikörper-Panels zu verschiedenen immunologischen Zellpopulationen sollte untersucht werden, ob die Ausdehnung des Tumors bei einer Lymphknotenentnahme und der weitere klinische Verlauf mit qualitativen und quantitativen Veränderungen dieser Zellpopulationen verbunden sind. Dabei stand nicht der Unterschied zwischen SLK und Nicht-Sentinel-Lymphknoten (NSLK) bzw. positiven und negativen SLK im Vordergrund, der bereits von verschiedenen Autoren untersucht wurde (Essner und Kojima 2001; Cochran et al. 2004; Mansfield et al. 2011; Mohos et al. 2013; Messaoudene et al. 2015), sondern stattdessen wurde der Fokus auf tumorpositive SLK gerichtet.

Dabei sollten im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Fragen beantwortet werden:

- 1. Wirkt sich die Tumorassoziation oder -infiltration unterschiedlicher Zellpopulationen bei positiven SLKs auf den klinischen Verlauf aus?
- 2. Wirkt sich die Tumorassoziation oder -infiltration unterschiedlicher Zellpopulationen bei positiven SLKs auf die Tumorausdehnung aus?
- 3. Wirkt sich die Zellanzahl unterschiedlicher Zellpopulationen in positiven SLKs auf den klinischen Verlauf aus?
- 4. Wirkt sich die Zellanzahl unterschiedlicher Zellpopulationen in positiven SLKs auf die Tumorausdehnung aus?
- 5. Werden einzelne Antigene vom Melanom exprimiert?

#### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Patienten

Die für diese Analysen verwendeten SLKs stammen von Patienten, bei denen in den Jahren 1999-2014 am Universitätsklinikum Göttingen im Rahmen des Melanom-Stagings eine SLK-Biopsie durchgeführt wurde. Zur klinischen Diagnostik wurden diese Lymphknoten nach dem Göttinger Scheibenprotokoll aufgearbeitet und in Paraffinblöcke eingebettet. Die histopathologische Untersuchung zeigte bei allen Lymphknoten Melanomzellen. Als therapeutische Konsequenz wurde bei allen Patienten eine komplette Lymphadenektomie durchgeführt. Das entnommene Gewebe wurde nach der klinischen Diagnostik archiviert und im Archiv der Hautklinik der Universitätsmedizin Göttingen aufbewahrt. Insgesamt umfasst das Kollektiv 77 SLKs von 59 Patienten.

Anhand ebenfalls archivierter Hämatoxylin-Eosin- und MelanA-Schnitte evaluierte ein erfahrener Pathologe, welcher Paraffinblock pro SLK für die weitere immunhistochemische Untersuchung verwendet werden sollte. Es wurde der Block ausgewählt, der repräsentativ war und die beste Gewebequalität und die größte Tumormasse aufwies. Die Einteilung der untersuchten Lymphknoten in vier Kohorten erfolgte durch einen erfahrenen Dermatologen unter Berücksichtigung des Ausmaßes der Tumorausdehnung und des klinischen Verlaufs. Die 77 Fälle mit klinisch bekanntem Verlauf wurden verblindet anhand eines standardisierten Auswerteprotokolls untersucht und ausgewertet. Nach der Entblindung erfolgte dann die statistische Korrelation mit dem Krankheitsverlauf.

Diese retrospektive Analyse wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen unter der Antragsnummer 12/5/16 genehmigt.

#### 2.2 Immunhistochemie

Die ausgewählten Paraffinblöcke wurden zunächst für fünf bis zehn Minuten auf einer Kühlplatte (pfm Cooling Plate 4100, pfm medical, Köln, DE) mit einer Temperatur von -10 °C gekühlt. Mit einem Mikrotom (Microm HM400, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden ca. 2 μm dünne Paraffinschnitte hergestellt, wobei von jedem Paraffinblock 18 Schnitte abgetragen wurden. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad (42900, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, DE) mit destilliertem Wasser überführt und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Danach wurden die Objektträger für fünf Minuten in ein Warmwasserbad (JAW-0100-001, Cellpath, Newtown, UK) mit einer Temperatur von 36 °C gelegt, um sie dann für weitere fünf Minuten auf einer Wärmeplatte (OTS 40.3040, Medite, Burgdorf, DE) bei 36 °C anzutrocknen. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 60 °C im Brutschrank getrocknet (UN75, Memmert, Schwabach, DE).

Die Immunfärbungen erfolgten in Abhängigkeit vom Antikörper mit dem Dako Autostainer Link 48 in Kombination mit dem PT Link oder mit dem Dako Omnis (Dako, Agilent, Santa Clara, USA). Pro Paraffinschnitt erfolgte eine Immunfärbung. Alle Antikörper werden im Rahmen der klinischen Diagnostik und Forschung am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen standardmäßig genutzt. Antikörper, deren Konzentration vor der Färbung verringert werden musste, wurden mit Diluent (Dako, Agilent, Santa Clara, USA) verdünnt.

Die Entparaffinierung und Antigendemaskierung der Paraffinschnitte zur Untersuchung von CD40, CD80, IDO und iNOS erfolgten im Dako PT Link für 15 Minuten bei 97 °C mit den Lösungen EnVision<sup>TM</sup> Flex Target Retrieval Solution low pH bzw. EnVision<sup>TM</sup> Flex Target Retrieval Solution high pH (Dako, Agilent, Santa Clara, USA). Danach wurden die Schnitte für die Immunfärbung in den Dako Autostainer Link 48 überführt. Das Protokoll für die Färbung wird in Tabelle 9 aufgeführt. Es wurde kein Verstärker verwendet.

Die Entparaffinierung, Antigendesmaskierung und Immunfärbung der Paraffinschnitte zur Untersuchung von MelanA, CD1a, CD4, CD8, CD20, CD56, CD57, CD68, CD138, GATA3 und MCT erfolgten im Dako Omnis Färbeautomaten. Das Protokoll für die Färbung wird in Tabelle 10 aufgeführt. Die Inkubationszeit der primären Antikörper von MelanA und GATA3 lag bei 30 Minuten, während sie bei den verbleibenden Antikörpern bei 20 Minuten lag. Der Arbeitsschritt "sekundäres Reagenz", also die Verwendung eines Verstärkers, wurde bei den Färbungen für MelanA, CD1a, CD4, CD20, CD56, CD138 und GATA3 durchgeführt.

Im Anschluss an die Immunfärbung wurden alle Schnitte in einen Objektträgerhalter überführt und in aufsteigender Alkoholreihe (75 % → 96 % → 3-mal 100 % → 3-mal Xylol) á fünf Sekunden dehydratisiert. Zuletzt erfolgte die Eindeckung mit einem Einbettautomaten (Tissue-Tek Prisma-E2S, Sakura Finetek, Staufen, DE).

Sämtliche Paraffinschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Oberkochen, DE) untersucht. Die für die Auswertung benötigten Digitalbilder wurden mit einer aufgesetzten Kamera (Axiocam 105 color, Carl Zeiss, Oberkochen, DE) aufgenommen.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Anti- körper	Klona- lität	Wirt	Konzen- tration	pH Puffer- lösung	Linker	Färbe- automat	Hersteller
MelanA IR633	mono- klonal	Maus	ready-to-use	high	Maus	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD8 IR623	mono- klonal	Maus	ready-to-use	high	ohne	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD20 GA604	mono- klonal	Maus	ready-to-use	high	Maus	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD56 IR628	mono- klonal	Kaninchen Klon	ready-to-use	high	Maus	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD57 IR647	mono- klonal	Maus Klon	ready-to-use	high	ohne	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD68 GA609	mono- klonal	Maus Klon	ready-to-use	high	ohne	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD1a IR069	mono- klonal	Maus	ready-to-use	high	Maus	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD138 GA642	mono- klonal	Maus Klon	ready-to-use	high	Maus	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
MCT IR640	mono- klonal	Maus Klon	ready-to-use	high	ohne	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
CD4 IR649	mono- klonal	Maus Klon	ready-to-use	high	Maus	Omnis	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
GATA3 L50-823	mono- klonal	Maus	1:250	high	Maus	Omnis	Cell Marque Corporation, Rocklin, USA
CD40 TA351052	poly- klonal	Kaninchen	1:200	low	ohne	PT Link + Autostainer Link 48	Acris, OriGene, Rockville, USA
CD80 MAB140	mono- klonal	Maus	1:100	low	ohne	PT Link + Autostainer Link 48	RnD Systems, Minneapolis, USA
iNOS AB5384	poly- klonal	Kaninchen	1:2500	high	ohne	PT Link + Autostainer Link 48	Chemicon® Merck Millipore, Burlington, USA
IDO HPA023072	poly- klonal	Kaninchen	1:100	low	ohne	PT Link + Autostainer Link 48	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 9: Färbeprotokoll zum Dako Autostainer Link 48

Arbeitsschritt	Reagenz	Hersteller	Inkubation
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	0
Endogen-Enzymblock	Envision <sup>TM</sup> Flex <i>Peroxidase- Blocking Reagent</i> SM801	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	5 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	0
Primärer Antikörper	siehe Tabelle 8	siehe Tabelle 8	30 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	0
Markiertes Polymer	Envision <sup>TM</sup> Flex/HRP SM802	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	20 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	0
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	5 min
Substrat-Chromogen	Envision <sup>TM</sup> Flex DAB+ Chromogen SM803	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	0
Gegenfärbung	Envision <sup>TM</sup> Flex Hematoxylin SM806	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	8 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer K8007	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	0
Waschen	destilliertes Wasser		0

Tabelle 10: Färbeprotokoll zum Dako Omnis

Arbeitsschritt	Reagenz	Hersteller	Inkubation
Entparaffinierung	Clearify <sup>TM</sup> GC810	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	1 min
Waschen	destilliertes Wasser		5 s
Demaskierung	Envision <sup>TM</sup> Flex TRS, high pH GV823 Envision <sup>TM</sup> Flex TRS, low pH GV823 + GV805	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	30 min

Arbeitsschritt	Reagenz	Hersteller	Inkubation
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	2-mal 2:40 min
Primärer	siehe Tabelle 8	siehe Tabelle 8	20 min
Antikörper			30 min: MelanA, GATA3
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Endogen- Enzymblock	Envision <sup>TM</sup> Flex Peroxidase- Blocking Reagent GV823	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	3 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Sekundäres Reagenz	Envision <sup>TM</sup> Flex+ Mouse Linker GV821	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal <i>2</i> min
Markiertes Polymer	Envision <sup>TM</sup> Flex/HRP GV823	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	20 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Waschen	destilliertes Wasser		30 s
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Substrat- Chromogen	Envision <sup>TM</sup> Flex DAB+ Chromogen GV823	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	5 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Waschen	destilliertes Wasser		30 s
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min
Gegenfärbung	Envision <sup>TM</sup> Flex Hematoxylin GC808	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	3 min
Waschen	destilliertes Wasser		10-mal 2 min
Waschen	Pufferlösung Wash Buffer GC807	Dako, Agilent, Santa Clara, USA	10-mal 2 min

# 2.3 Auswertung der immunhistochemischen Präparate

#### 2.3.1 Tumorassoziation

Die Auswertung der Tumorassoziation (TA) erfolgte semiquantitativ anhand eines festgelegten Scores. Mikroskopisch wurde untersucht, ob sich die gefärbten Immunzellen an den Metastasenrand anlagern. Wenn die Metastase in dem Anschnitt, entweder wegen Gewebeabschwemmungen oder wegen eines zu geringen Tumordurchmessers, nicht erkennbar war, dann wurde der Schnitt mit einem n für "nicht auswertbar" markiert. Um das Ausmaß der Tumorassoziation standardisiert vergleichen zu können, wurde ein semiquantitativer Score entwickelt, der in Tabelle 11 dargestellt wird.

Tabelle 11: Score der semiquantitativen Auswertung der Tumorassoziation

Tumorassoziation	Definition
n	Nicht auswertbar
0	Keine Tumorassoziation
1	1-25 % zirkulär assoziiert
2	26-50 % zirkulär assoziiert
3	> 50 % zirkulär assoziiert

#### 2.3.2 Tumorinfiltration

Die Auswertung der Tumorinfiltration (TI) erfolgte semiquantitativ anhand eines festgelegten Scores. Dabei wurde mikroskopisch untersucht, ob die gefärbten Immunzellen den Tumor infiltrieren. Wenn die Metastase in dem Anschnitt, entweder wegen Gewebeabschwemmungen, oder wegen eines zu geringen Tumordurchmessers, nicht erkennbar war , dann wurde der Schnitt mit einem n für "nicht auswertbar" markiert. Um das Ausmaß der Tumorinfiltration standardisiert vergleichen zu können, wurde ein semiquantitativer Score entwickelt, der in Tabelle 12 dargestellt wird.

Tabelle 12: Score der semiquantitativen Auswertung der Tumorinfiltration

Tumorinfiltration	Definition
n	Nicht auswertbar
0	Keine Tumorinfiltration
1	Infiltrierende Immunzellen einfach zählbar
2	Infiltrierende Immunzellen notfalls zählbar
3	Infiltrierende Immunzellen nicht zählbar, da zu zahlreich

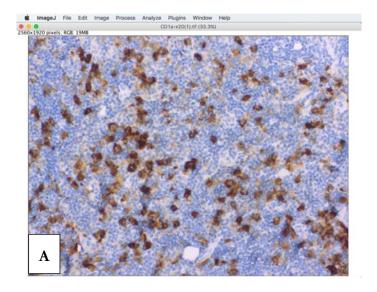
#### 2.3.3 Zellanzahl

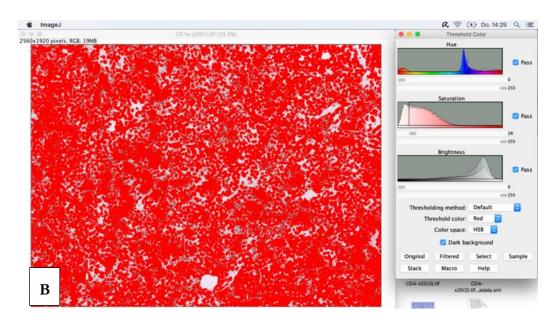
Um Unterschiede bei der Zellanzahl zwischen den verschiedenen Kohorten untersuchen zu können, wurde eine quantitative Analyse des Materials durchgeführt. Dazu wurden pro Immunfärbung/Paraffinschnitt bei 200-facher Vergrößerung drei hotspots bestimmt, die eine möglichst hohe Zahl positiv angefärbter Zellen aufwiesen. Diese hotspots wurden mit der Axiocam 105 color (Carl Zeiss, Oberkochen, DE) fotografiert und anschließend mit der Software ZEN (Carl Zeiss, Oberkochen, DE) digitalisiert.

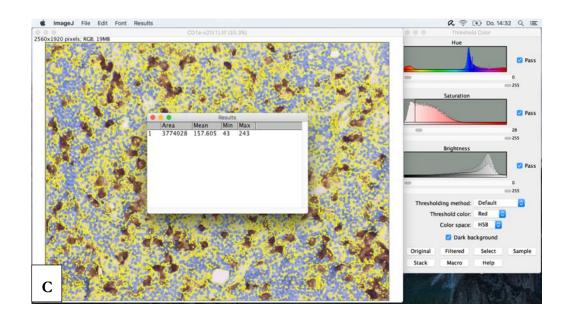
Zur weiteren quantitativen Analyse wurde das Computerprogramm ImageJ (ImageJ.net) verwendet. Dazu wurde, wie es in Abbildung 1 dargestellt wird, zunächst jedes Bild und damit jeder hotspot in seine Pixel segmentiert (4.915.200 Pixel). Zur Messung der gesamten Zellanzahl wurde die Funktion color threshold verwendet. Dabei wurden die Parameter Farbton, Sättigung und Helligkeit so justiert, dass zuerst alle Zellen des hotspots markiert waren, der Hintergrund jedoch ohne Markierung blieb. Die Fläche aller markierten Zellen wurde dann anhand der Pixelanzahl des markierten Gebietes bestimmt. Anschließend wurde die Justierung der Parameter Farbton, Sättigung und Helligkeit so durchgeführt, dass nur die durch Immunfärbung angefärbten Zellen markiert wurden.

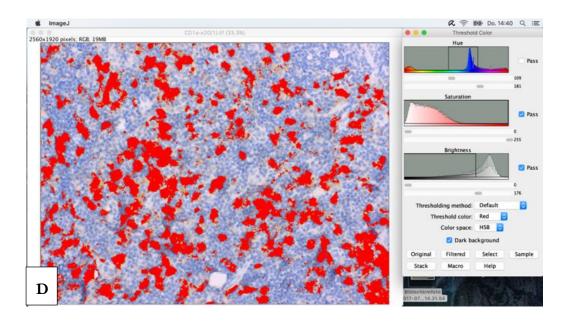
Dann wurde wiederum die Fläche der markierten Zellen, also aller positiven Immunzellen, anhand der Pixelanzahl bestimmt.

Zuletzt wurde die Pixelanzahl aller immungefärbten Zellen durch die Pixelanzahl aller Zellen dividiert, um dieses Verhältnis quantitativ als einen prozentualen Wert festzulegen. Der prozentuale Wert wird demnach definiert als das Verhältnis zwischen der Zellfläche aller positiv immungefärbten Zellen und der Zellfläche aller Zellen des Präparats, ohne eine Einbeziehung des Hintergrunds. Zellfläche und Zellanzahl sind proportional zueinander und haben stets dasselbe prozentuale Verhältnis hinsichtlich der Gesamtzellfläche bzw.-anzahl. Die Werte der drei hotspots pro Paraffinschnitt wurden für die weitere Analyse gemittelt.









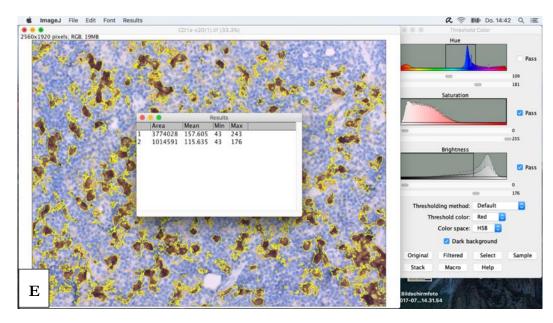


Abbildung 1: Quantitative Analyse der Zellanzahl. In A) ist als Beispiel ein hotspot CD1apositiver Zellen zu sehen. B) zeigt die Markierung aller im Paraffinschnitt enthaltenen Zellen.
In C) wird die markierte Fläche quantifiziert, indem die Pixel dieser Fläche gezählt werden.
D) zeigt die durch Änderung der Parameter durchgeführte Markierung der angefärbten
Immunzellen, deren Fläche in E) ebenfalls in Pixel überführt wird.

2 Material und Methoden 26

# 2.4 Kohorten-Einteilung

Die Einteilung der Kohorten war bereits vor der quantitativ-qualitativen Auswertung durch die Hautklinik der UMG erfolgt, sie war aber wegen der Verblindung während des Auswertungsprozesses unbekannt.

Insgesamt erfolgte die Einteilung in vier verschiedene Kohorten, die sich in der Tumorausdehnung und der Prognose unterschieden.

Das Follow-up erfolgte über mindestens 65 Monate oder bis zum Tod.

# 2.4.1 Kohorte I: "in-situ-Metastasen", sehr gute Prognose

Als "in-situ-Metastasen" wurden sehr kleine Metastasen im SLK mit mikroanatomisch subkapsulärer Lage definiert. Die Patienten dieser Kohorte haben eine ausgezeichnete Prognose (Vuylsteke et al. 2005; Francischetto et al. 2010; van der Ploeg et al. 2011). Die Metastasengröße bei den Patienten dieser Kohorte war sehr gering: Der Metastasen-Durchmesser lag bei maximal 0,3 mm und die Invasionstiefe nach Starz lag ebenfalls bei maximal 0,3 mm (SI). Patienten dieser Fallgruppe hatten eine sehr gute Prognose und blieben ohne Rezidiv und Todesfälle.

# 2.4.2 Kohorte II: geringe Tumorlast, gute Prognose

Als geringe Tumorlast wurde eine geringe Metastasengröße definiert: Der Metastasen-Durchmesser lag bei maximal 1,5 mm und die Invasionstiefe nach Starz bei maximal 1 mm (SII). Die Prognose dieser Patienten war gut und sie verstarben nicht während des Beobachtungszeitraums.

# 2.4.3 Kohorte III: geringe Tumorlast, schlechte Prognose

Als geringe Tumorlast wurde eine geringe Metastasengröße definiert: Der Metastasen-Durchmesser lag bei maximal 1,5 mm und die Invasionstiefe nach Starz bei maximal 1 mm (SII). Die Prognose dieser Patienten war schlecht: Sie bekamen sehr früh ein Rezidiv, in dessen Folge sie verstarben.

#### 2.4.4 Kohorte IV: hohe Tumorlast, gute Prognose

Als hohe Tumorlast wurden ein Metastasen-Durchmesser von mindestens 1,5 mm und eine Invasionstiefe nach Starz von über 1 mm (SIII) definiert. Die Prognose dieser Patienten war gut und sie blieben über den Beobachtungszeitraum am Leben.

2 Material und Methoden 27

# 2.5 Statistische Auswertung

Zunächst erfolgten die explorative Datenanalyse und die deskriptive Statistik zur Erstellung einer Übersicht von Mittelwerten, Standardabweichungen und Medianen. Wegen einer nicht vorhandenen Normalverteilung wurde die statistische Auswertung mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Testergebnisse erfolgte durch Box-Plot-Diagramme, wobei der Mittelstrich des Diagramms jeweils den Median anzeigt. Die Box zeigt den Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die Linien schließen 95 % der Daten ein.

Mit der Spearman-Rangkorrelation wurde eine bivariate Analyse der Messergebnisse durchgeführt.

Der Signifikanzwert p < 0.05 wurde in beiden Tests als signifikant definiert.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS 23.0 verwendet.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Patientenkollektiv

Das Kollektiv umfasste 59 Patienten, bei denen im Rahmen des klinischen Stagings eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie an der Hautklinik der UMG durchgeführt worden war. Von den anfangs herangezogenen 82 Fällen waren insgesamt fünf Fälle wegen Abschwemmungen oder starken Zerstörungen während des immunhistochemischen Färbungsprozesses nicht auswertbar. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren der jüngste Patient 9 Jahre und der älteste 84 Jahre alt. Der mittlere Altersdurchschnitt aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 51,4 Jahren. 32 Patienten waren männlichen und 27 Patienten weiblichen Geschlechts.

Der häufigste histologische Subtyp war das NM, das bei 33 Patienten diagnostiziert wurde, gefolgt vom SSM, das bei 14 Patienten diagnostiziert wurde. Das Follow-up erfolgte über mindestens 65 Monate oder bis zum Tod. Das durchschnittliche Follow-up lag bei 94 Monaten. Alle Patienten der Kohorte III verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums, aber nicht die Patienten der Kohorten I, II und IV. Der durchschnittliche Metastasen-Durchmesser war mit 0,14 mm in Kohorte I am geringsten, danach folgten mit 0,46 mm und 0,5 mm die Kohorten II und III und am höchsten war er in Kohorte IV mit 4,58 mm. Der gesamtdurchschnittliche Durchmesser lag bei 1,06 mm. Weitere klinisch-pathologische Faktoren des Patientenkollektivs werden in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Klinisch-pathologische Faktoren des Patientenkollektivs

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV	Gesamt
Definition	"in-situ- Metastasen"	Geringe Tumorlast	Geringe Tumorlast	Hohe Tumorlast	
	Sehr gute Prognose	Gute Prognose	Schlechte Prognose	Gute Prognose	
Patientenanzahl p	11	22	17	9	59
Fallzahl n	12	28	22	15	77
Altersspanne (Jahre)	9-78	12-81	24-84	21-71	9-84
Altersdurchschnitt (Jahre)	52,2	50,6	52,8	50,1	51,4
Geschlecht (männlich/weiblich)	5 / 6	11 / 11	11 / 6	5 / 4	32 / 27
Histologischer Subtyp SSM NM LMM ALM	1 6 1	7 10 1	3 12 1	3 5 1 0	14 33 4 3
UCM Anzahl der Fälle mit Ulzeration	1	4	9	5	5 19
Beobachtungszeitraum (Monate)	71-127	65-182	14-73	79-143	14-182
Beobachtungszeitraum Durchschnitt (Monate)	111	117	38	114	94
Anzahl Todesfälle	0	0	17	0	0
$\begin{aligned} & \text{Breslow-Index} \\ & & T_1 \\ & & T_2 \\ & & T_3 \end{aligned}$	2 6 1	4 8 9	3 1 8	0 3 1	9 18 18
T <sub>4</sub> Durchschnitt Metastasen- Durchmesser (mm)	0,14	0,46	5 0,50	5 4,58	13

# 3.2 Immunzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort

## 3.2.1 CD8

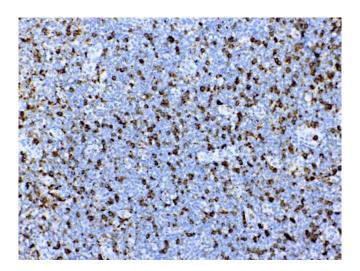


Abbildung 2: Färbeergebnis CD8 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Die ausgewerteten immunhistochemischen Färbeergebnisse von CD8 zeigten eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war in allen Fällen stark (siehe Abbildung 2). Es waren keine unspezifischen Hintergrundfärbungen erkennbar. Insgesamt waren zehn Färbungen abgeschwemmt, die deshalb nicht in die Auswertung einbezogen wurden. Es gab keine Schnitte mit einem negativen Färbeergebnis.

Tabelle 14: Protokoll des Färbeergebnisses CD8

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- Assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	0
II (28)	4	0,14	4	4	0
III (22)	3	0,13	3	3	0
IV (15)	3	0,2	7	7	0
gesamt (77)	10	0,13	14	14	0

Für die Auswertung der Tumorassoziation und -infiltration standen nur wenige geeignete Paraffinschnitte mit ausreichend großer Tumormasse zur Verfügung. Denn die tumorinfiltrierten Areale im Lymphknoten waren entweder wegen eines zu geringen Metastasen-Durchmessers ohne eine tumorspezifische Immunfärbung nicht eindeutig identifizierbar oder sie waren nicht mehr angeschnitten.

Die meisten auswertbaren Schnitte fanden sich in Kohorte IV (siehe Tabelle 14). In Kohorte I konnte die Auswertung von TA und TI wegen der sehr geringen Tumorlast nicht durchgeführt werden, weshalb diese Kohorte auch nicht im Säulendiagramm aufgeführt wurde. In den Kohorten II-IV zeigten die ausgewerteten Schnitte im Mittel eine sehr deutliche Tumorassoziation mit 26-50 % zirkulärer Tumorassoziation (Score 2) und - infiltration (Score 1, siehe Abbildungen 3 und 4) vereinzelter zytotoxischer T-Zellen. Beim Mann-Whitney-U-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten II-IV.

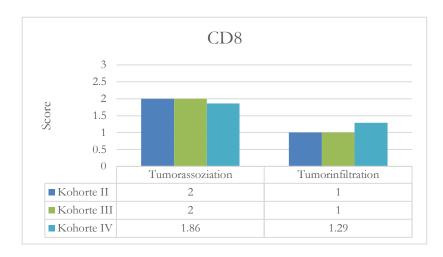


Abbildung 3: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI zytotoxischer T-Zellen in den Kohorten II-IV.

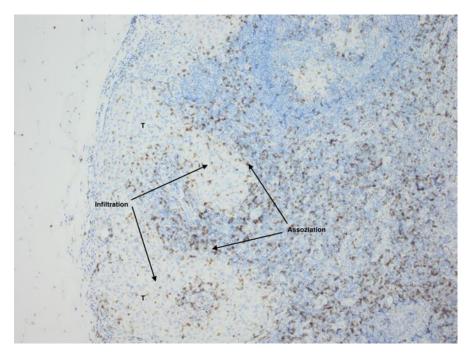


Abbildung 4: TA und TI CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen. Im Präparat zeigte sich eine hohe Tumorlast bei zirkulärer Assoziation CD8-positiver Immunzellen (Score 2) und deutlicher Infiltration (Score 2).

Der Box-Plot in Abbildung 5 verdeutlicht den Anteil CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der unterschiedlichen Fallgruppen. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten I-IV. Mittelwert und Median des Anteils zytotoxischer T-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV werden in Tabelle 15 dargestellt.

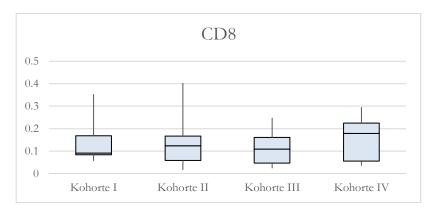


Abbildung 5: Anteil CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 15: Mittelwert und Median des Anteils zytotoxischer T-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,136 ± 0,097	$0,126 \pm 0,088$	0,113 ± 0,071	0,157 ± 0,092
Median	0,091	0,123	0,108	0,178

Mit der Spearman-Rangkorrelation wurde untersucht, ob ein Anstieg von CD8 mit dem Anstieg anderer Antikörper korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 16 aufgeführten Korrelationen. Alle Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD8 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 16: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD8

	CD56	CD68	CD4	Gata3	CD25	CD40	IDO
Korrelationskoeffizient	0,339	0,360	0,608	0,246	0,252	0,271	0,268
Signifikanz	0,004	0,002	0,000	0,039	0,034	0,020	0,026

#### 3.2.2 CD20

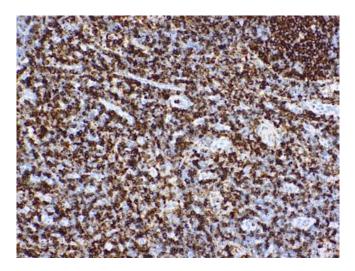


Abbildung 6: Färbeergebnis CD20 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war in allen Fällen stark (siehe Abbildung 6). Teilweise waren leichte unspezifische Hintergrundfärbungen ohne Einfluss auf die Auswertung erkennbar. Im Vergleich zu anderen Immunfärbungen war der Anteil positiv angefärbter Zellen höher. Insgesamt waren fünf Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Es gab keine Schnitte mit negativem Färbeergebnis.

Tabelle 17: Protokoll des Färbeergebnisses CD20

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	0
II (28)	3	0,10	4	4	0
III (22)	0	0	6	6	0
IV (15)	2	0,13	5	5	0
gesamt (77)	5	0,06	15	15	0

Die Anzahl der zur Beurteilung von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte innerhalb der Kohorten wird in Tabelle 17 dargestellt. Die verminderte Anzahl auswertbarer Fälle kann man darauf zurückführen, dass das Tumorgewebe ohne spezifische Färbung nicht eindeutig erkennbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Die auswertbaren Schnitte waren gleichmäßig auf die Kohorten II-IV verteilt. Kohorte I fiel wegen der sehr kleinen Tumormasse aus der Auswertung heraus. Die ausgewerteten Fälle zeigten im Mittel eine sehr deutliche TA (Score 2-3).

Die Unterschiede innerhalb der Kohorten waren nicht signifikant. Auch TI zeigte sich in den Kohorten II-IV und am deutlichsten in Kohorte IV (Score 1,8, siehe Abbildungen 7 und 8). Dieser Unterschied war nach dem Mann-Whitney-U-Test signifikant (p = 0,01).

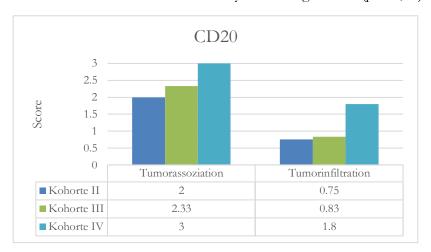


Abbildung 7: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD20-positiver B-Zellen in den Kohorten II-IV.

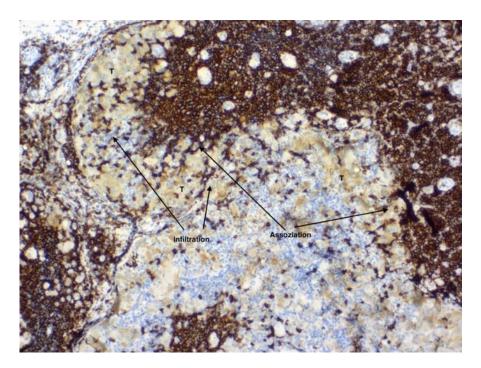


Abbildung 8: TA und TI CD20-positiver B-Zellen. Präparat aus Kohorte mit geringer Tumorlast. Es zeigten sich eine sehr deutliche Assoziation (Score 3) und auch eine deutliche Infiltration (Score 2) in das Tumorgewebe.

Der Box-Plot in Abbildung 9 zeigt den Anteil CD20-positiver B-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten I-IV.

Mittelwert und Median des Anteils CD20-positiver B-Zellen in den Kohorten werden in Tabelle 18 dargestellt. Beide Werte waren deutlich höher als bei den übrigen Immunfärbungen des Panels.

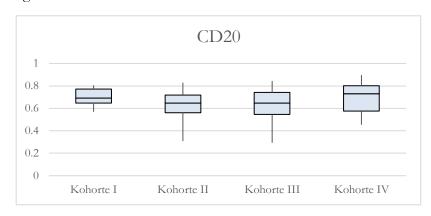


Abbildung 9: Anteil CD20-positiver B-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 18: Mittelwert und Median des Anteils CD20-positiver B-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,699 ± 0,076	$0,625 \pm 0,132$	$0,632 \pm 0,159$	$0,695 \pm 0,145$
Median	0,690	0,648	0,647	0,729

Mit einer Spearman-Rangkorrelation wurde untersucht, ob ein Anstieg von CD20 positiv oder negativ mit anderen Antikörpern korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 19 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Alle Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD20 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 19: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD20

	CD57	CD68	Gata3	CD40	IDO
Korrelationskoeffizient	0,328	0,234	0,258	0,225	0,289
Signifikanz	0,004	0,044	0,026	0,046	0,013

#### 3.2.3 CD56

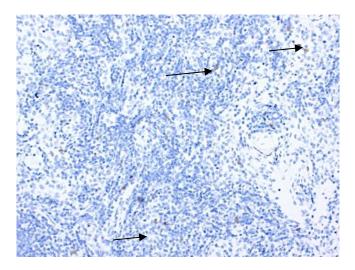


Abbildung 10: Färbeergebnis CD56 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war schwach bis moderat. Teilweise waren unspezifische Hintergrundfärbungen ohne einen Einfluss auf die Auswertung erkennbar (siehe Abbildung 10).

Wegen der geringen Zellzahl CD56-positiver NK-Zellen im Lymphknoten erwies sich die Aufteilung in *hotspots* als schwierig. Insgesamt waren acht Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Keine Anfärbung zeigte sich bei 15 Färbungen, was sich ebenfalls auf die allgemein geringe Anzahl positiver Zellen zurückführen lässt.

Tabelle 20: Protokoll des Färbeergebnisses CD56

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	2
II (28)	3	0,10	3	3	7
III (22)	4	0,18	2	2	2
IV (15)	1	0,06	6	6	4
Gesamt (77)	8	0,10	11	11	15

Sowohl bei TA als auch TI war die Anzahl auswertbarer Paraffinschnitte limitiert, da Lymphknotenareale mit Tumorgewebe ohne tumorspezifische Färbung nicht eindeutig erkennbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten waren (siehe Tabelle 20).

Die wenigen CD56-positiven NK-Zellen zeigten keinerlei Assoziation an das Tumorgewebe. TI war spärlich in zwei Fällen der Kohorte IV zu erkennen (siehe Abbildung 11). Statistisch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten II-IV.

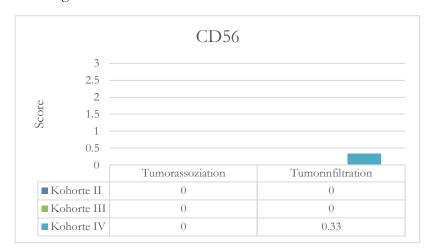


Abbildung 11: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD56-positiver NK-Zellen in den Kohorten II-IV.

Der Box-Plot in Abbildung 12 zeigt den Anteil angefärbter CD56-positiver NK-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikante Unterschiede: Die Zellzahl in den Kohorten I, II und IV war signifikant vermindert gegenüber Kohorte III (p = 0.038, p = 0.005, p = 0,048) Auch beim Vergleich der Kohorten I, II und IV im Hinblick auf die Prognose zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied0,003). Der Anteil positiv angefärbter NK-Zellen war im Vergleich zu den anderen Immunfärbungen des Panels sehr gering. Mittelwerte und Mediane des Anteils CD56-positiver NK-Zellen in den Kohorten I-IV werden in der Tabelle 21 dargestellt.

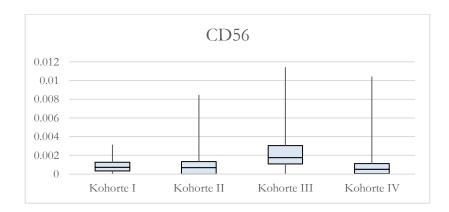


Abbildung 12: Anteil CD56-positiver NK-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 21: Mittelwert und Median des Anteils CD56-positiver NK-Zellen an der Gesamt-Immunzellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	$0,000953 \pm 0,000944$	0,0011 ± 0,0019	$0,0027 \pm 0,0029$	$0,0017 \pm 0,0029$
Median	0,00071	0,00068	0,0018	0,00051

Mit einer Rangkorrelation nach Spearman wurde verglichen, ob ein Anstieg der CD56positiven Zellen negativ oder positiv mit dem Anteil anderer Antikörper korrelierte. Die
Spearman-Rangkorrelation ergab zwei statistische Signifikanzen (siehe Tabelle 22). Beide
Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD56 mit einem Anstieg
des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 22: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD56

	CD8	CD4
Korrelationskoeffizient	0,339	0,571
Signifikanz	0,004	0,000

#### 3.2.4 CD57

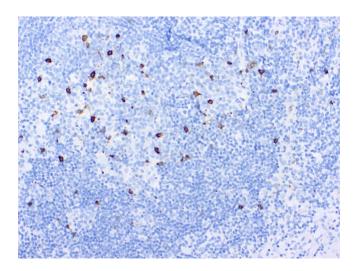


Abbildung 13: Färbeergebnis CD57 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war in allen Fällen stark. Die angefärbten Zellen waren hauptsächlich in den Keimzentren lokalisiert. Es waren keine unspezifischen Hintergrundfärbungen erkennbar (siehe Abbildung 13). Insgesamt waren sieben Färbungen abgeschwemmt, welche deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei allen Schnitten zeigte sich eine positive Anfärbung.

Tabelle 23: Protokoll des Färbeergebnisses CD57

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	0
II (28)	5	0,17	3	3	0
III (22)	2	0,09	2	2	0
IV (15)	0	0	7	7	0
Gesamt (77)	7	0,09	12	12	0

Die Anzahl der für die Auswertung von TA und TI verfügbaren Schnitte war vermindert, da das Tumorgewebe ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht eindeutig identifizierbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I fiel aufgrund zu geringer Tumorlast aus der Auswertung heraus. Kohorte IV enthielt die meisten auswertbaren Paraffinschnitte (siehe Tabelle 23). In den Kohorten II und IV war eine geringe TA < 25 % festzustellen und Kohorte III zeigte keine TA (siehe Abbildung 14). Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Unterschied (p = 0,001) zwischen den Kohorten III und IV, allerdings bei einer sehr geringen Fallzahl in Kohorte III.

Vereinzelt infiltrierten CD57-positive Zellen in das Tumorgewebe, allerdings ohne einen erkennbaren Unterschied zwischen den Kohorten II-IV. Bei der subjektiven Betrachtung erschien es so, als würden sich in Tumornähe vermehrt Keimzentren ausbilden (siehe Abbildung 15).

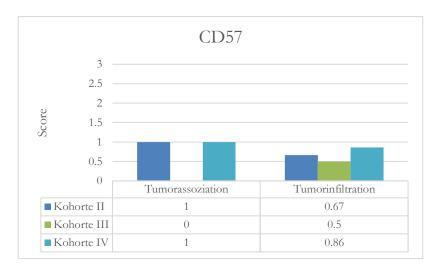


Abbildung 14: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD57-positiver Zellen in den Kohorten II-IV.

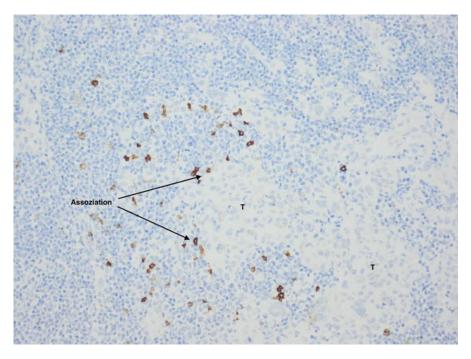


Abbildung 15: TA CD57-positiver Zellen. Präparat mit geringer Tumorlast. Keimzentrum in direkter Nähe zum Tumorgewebe ausgebildet. Die zirkuläre Assoziation war gering (Score 1). Tumorinfiltrierende CD57-positive Zellen waren nicht vorhanden (Score 0).

Der Box-Plot in Abbildung 16 zeigt den Anteil angefärbter CD57-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV.

Der Mann-Whitney-U-Test ergab die folgenden signifikanten Unterschiede: Die Zellzahl CD57-positiver Zellen in den Kohorten II und IV war signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.025, p = 0.005). Die Zellzahl in den Kohorten I und II war zusammen signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.026). Bei einer Zusammenfassung der Kohorten I, II und IV im Hinblick auf die Prognose war CD57 signifikant erhöht gegenüber Kohorte III (p = 0.006). Mittelwerte und Mediane des Anteils CD57-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV werden in Tabelle 24 dargestellt.

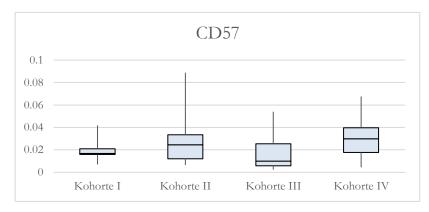


Abbildung 16: Anteil CD57-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 24: Mittelwert und Median des Anteils CD57-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,020 ± 0,010	0,028 ± 0,021	0,017 ± 0,016	$0,032 \pm 0,019$
Median	0,017	0,024	0,010	0,030

Um zu überprüfen, ob ein Anstieg der Anzahl CD57-positiver Zellen positiv oder negativ mit anderen Antikörpern korrelierte, wurde eine Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Die Spearman-Rangkorrelation zeigte zwei statistische Signifikanzen (siehe Tabelle 25). Beide Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD57 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 25: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD57

	MCT	CD20
Korrelationskoeffizient	0,336	0,328
Signifikanz	0,004	0,004

# 3.2.5 CD68

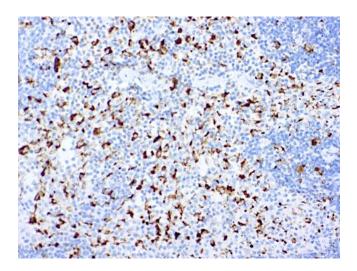


Abbildung 17: Färbeergebnis CD68 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war in allen Fällen stark. Es waren keine unspezifischen Hintergrundfärbungen erkennbar (siehe Abbildung 17). Insgesamt waren neun Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden Bei allen Schnitten zeigte sich eine positive Anfärbung.

Tabelle 26: Protokoll des Färbeergebnisses CD68

Kohorte	Abgeschwemmte	Abgeschwemmte	Tumor-	Tumor-	Keine
(Fallanzahl)	Fälle (Anzahl)	Fälle (Anteil)	assoziation	infiltration	Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	0
II (28)	4	0,14	3	3	0
III (22)	3	0,13	4	4	0
IV (15)	1	0,06	8	8	0
Gesamt (77)	9	0,11	15	15	0

Die zur Auswertung von TA und TI verfügbaren Paraffinschnitte waren limitiert, da das Tumorgewebe im LK ohne tumorspezifische Immunfärbung oft nicht erkennbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I enthielt aufgrund der geringen Tumorlast keine auswertbaren Schnitte. Kohorte IV enthielt wegen der hohen Tumorlast die meisten auswertbaren Paraffinschnitte (siehe Tabelle 26). In den Kohorten II-IV zeigte sich die Assoziation CD68-positiver Makrophagen an das Tumorgewebe, was mit einem mittleren Score von 1,88 am stärksten in der Kohorte IV ausgeprägt war (siehe Abbildungen 18 und 19). Der Unterschied war aber nicht signifikant.

In Kohorte IV war auch die Tumorinfiltration CD68-positiver Makrophagen am stärksten ausgeprägt, wobei der Unterschied gegenüber den Kohorten II und III nach dem Mann-Whitney-U-Test signifikant war (p = 0,045).

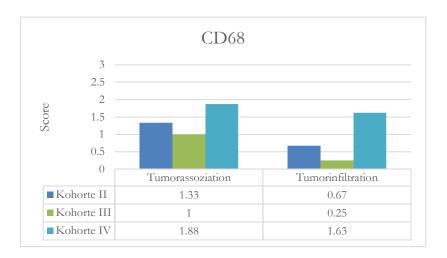


Abbildung 18: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD68-positiver Makrophagen in den Kohorten II-IV.

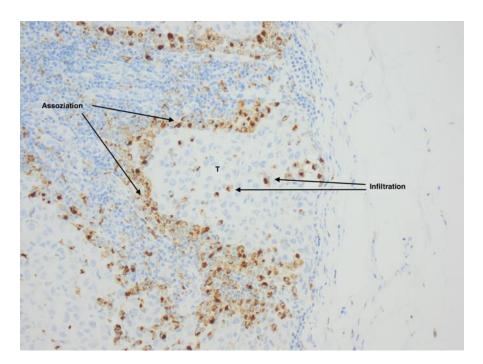


Abbildung 19: TA und TI CD68-positiver Makrophagen. Präparat mit hoher Tumorlast. Es zeigten sich eine sehr deutliche Tumorassoziation (Score 3) und Tumorinfiltration (Score 2).

Der Box-Plot in Abbildung 20 zeigt den Anteil angefärbter CD68-positiver Makrophagen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikante Unterschiede: Die Zellzahl in Kohorte I war signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.10). Bei einer Zusammenfassung der Kohorten I und II war die Zellzahl signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.042).

Bei einer Zusammenfassung der Kohorten I, II und IV im Hinblick auf die Prognose war CD68 in ihnen signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.042). Die Mittelwerte und Mediane des Anteils CD68-positiver Makrophagen in den Kohorten I-IV werden in der Tabelle 27 dargestellt.

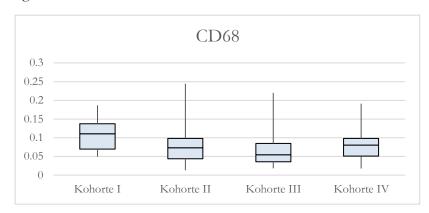


Abbildung 20: Anteil CD68-positiver Makrophagen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 27: Mittelwert und Median des Anteils CD68-positiver Makrophagen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,108 ± 0,044	0,080 ± 0,050	$0,066 \pm 0,046$	$0,081 \pm 0,043$
Median	0,110	0,073	0,055	0,080

Mit der Spearman-Rangkorrelation wurde untersucht, ob ein Anstieg von CD68 mit dem Anstieg anderer Antikörper korrelierte. Dabei zeigten sich die in Tabelle 28 aufgeführten Korrelationen. Alle Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD68 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 28: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD68

	MCT	CD1a	CD20	CD8	CD4	Gata3	CD40	IDO
Korrelationskoeffizient	0,323	0,291	0,234	0,360	0,324	0,387	0,314	0,377
Signifikanz	0,008	0,012	0,044	0,002	0,007	0,001	0,006	0,001

#### 3.2.6 CD1a

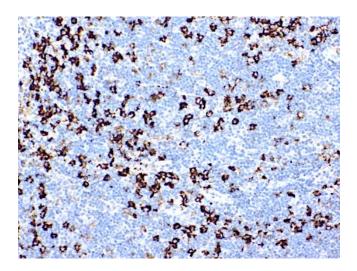


Abbildung 21: Färbeergebnis CD1a mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war in allen Fällen stark (siehe Abbildung 21). Teilweise waren unspezifische Hintergrundfärbungen erkennbar, die sich aber nicht auf die Auswertung auswirkten. Insgesamt waren acht Färbungen abgeschwemmt, welche die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Zwei Schnitte zeigten keine Anfärbung.

Tabelle 29: Protokoll des Färbeergebnisses CD1a

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	0
II (28)	3	0,10	4	4	1
III (22)	2	0,09	5	5	0
IV (15)	2	0,13	7	7	1
Gesamt (77)	8	0,10	16	16	2

Die Anzahl der zur Auswertung von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte war gering, da in vielen Fällen das Tumorgewebe ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht identifizierbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I enthielt aufgrund der sehr geringen Tumorlast keine auswertbaren Paraffinschnitte. Die meisten auswertbaren Paraffinschnitte waren in Kohorte IV zu finden, was auf die größere Tumorlast zurückzuführen war (siehe Tabelle 29). Der mittlere Score von TA und TI lag in den Kohorten bei < 1 und war dementsprechend in den Kohorten II-IV gering (siehe Abbildung 22). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten II-IV.

Zwei Fälle wiesen eine Expression von CD1a durch das Tumorgewebe auf (siehe Abbildung 23).

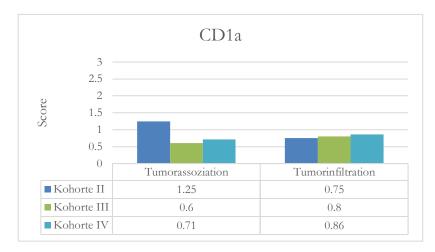
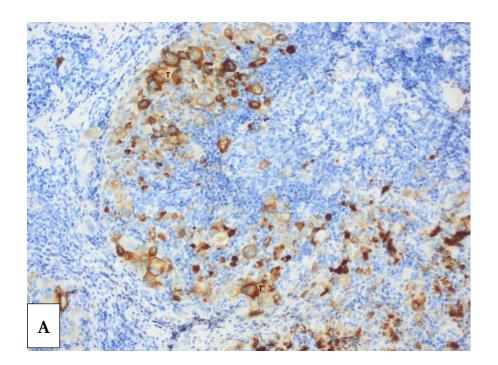


Abbildung 22: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD1a-positiver dendritischer Zellen in den Kohorten II-IV.



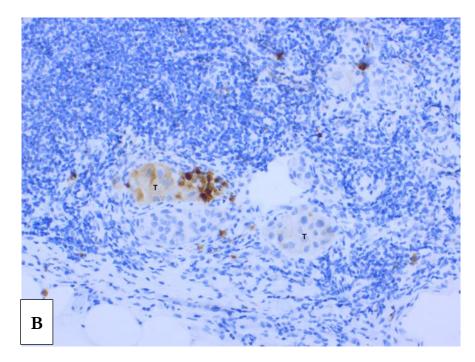


Abbildung 23: Expression von CD1a durch das Tumorgewebe. A) Das Präparat zeigte eine starke Expression bei hoher Tumorlast. B) Das Präparat zeigte eine partielle Expression bei geringer Tumorlast.

Der Box-Plot in Abbildung 24 zeigt den Anteil angefärbter CD1a-positiver dendritischer Zellen in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikante Unterschiede: Die Zellzahl in Kohorte I war signifikant erhöht gegenüber der Kohorte IV (p = 0.005). Bei einer Zusammenfassung der Kohorten I und II war die Zellzahl signifikant erhöht gegenüber der Kohorte IV (p = 0,012).

Bei einer Zusammenfassung der Kohorten I, II und III im Hinblick auf die Tumorlast war CD1a in ihnen signifikant erhöht gegenüber der Kohorte IV (p = 0.017). Mittelwerte und Mediane des Zellanteils CD1a-positiver dendritischer Zellen in den Kohorten I-IV werden in Tabelle 30 dargestellt.

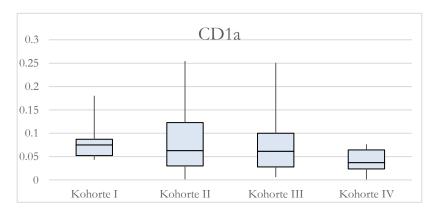


Abbildung 24: Anteil CD1a-positiver dendritischer Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 30: Mittelwert und Median des Anteils CD1a-positiver dendritischer Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,081 ± 0,042	0,093 ± 0,080	$0,075 \pm 0,063$	0,040 ± 0,026
Median	0,075	0,063	0,061	0,037

Mit einer Spearman-Rangkorrelation wurde überprüft, ob ein Anstieg CD1a-positiver dendritischer Zellen positiv oder negativ mit anderen Antikörpern korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 31 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Die Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD1a mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 31: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD1a

	MCT	CD68	Gata3
Korrelationskoeffizient	0,241	0,291	0,393
Signifikanz	0,048	0,012	0,001

# 3.2.7 CD138

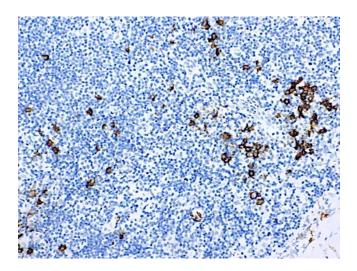


Abbildung 25: Färbeergebnis CD138 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war moderat bis stark (siehe Abbildung 25). Teilweise waren leichte und unspezifische Hintergrundfärbungen ohne einen Einfluss auf die Auswertung erkennbar. Zehn Paraffinschnitte waren von Abschwemmungen betroffen, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei keinem Schnitt war die Immunfärbung negativ.

Tabelle 32: Protokoll des Färbeergebnisses CD138

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	0
II (28)	6	0,21	5	5	0
III (22)	2	0,09	5	5	0
IV (15)	1	0,06	6	6	0
Gesamt (77)	10	0,13	16	16	0

Die Anzahl der für die Analyse von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte in den Kohorten I-IV war vermindert, weil das Tumorgewebe ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht eindeutig als solches zu identifizieren, angeschnittenes Tumorgewebe für die Auswertung zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I wies wegen der sehr geringen Tumorlast keine auswertbaren Fälle auf. Die auswertbaren Paraffinschnitte waren gleichmäßig auf die Kohorten II-IV verteilt (siehe Tabelle 32). Die größte mittlere TA wies Kohorte IV (Score 1,33) auf und der Unterschied gegenüber Kohorte III (Score 0,4) war dem Mann-Whitney-U-Test zufolge signifikant (p = 0,01; siehe Abbildung 26).

Der Unterschied des Scores zwischen den Kohorten II und IV war ohne statistische Signifikanz. Eine TI weniger CD138-positiver Zellen war lediglich in Kohorte IV zu finden und der Unterschied gegenüber den Kohorten II und III war statistisch signifikant (p = 0,001; siehe Abbildung 27).

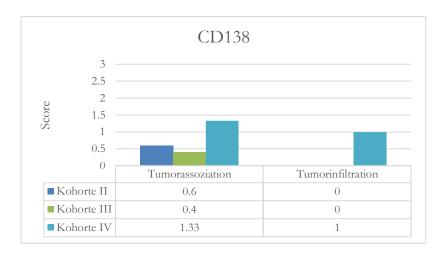


Abbildung 26: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD138-positiver Plasmazellen in den Kohorten II-IV.

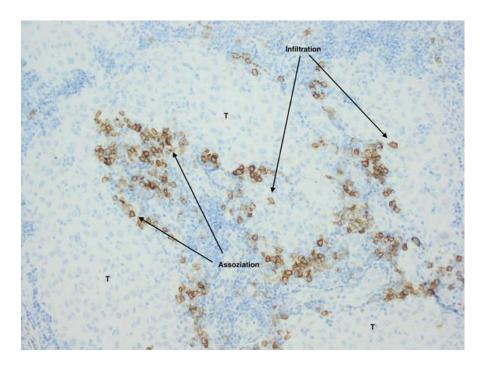


Abbildung 27: TA und TI CD138-positiver Plasmazellen. In dem Präparat mit hoher Tumorlast zeigten sich eine deutliche Tumorassoziation (Score 2) und eine geringe Infiltration (Score 1).

Der Box-Plot in Abbildung 28 zeigt den Anteil angefärbter CD138-positiver Plasmazellen an der Gesamt-Zellzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV.

Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten I-IV. Mittelwerte und Mediane der Zellanzahl der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 33 dargestellt.

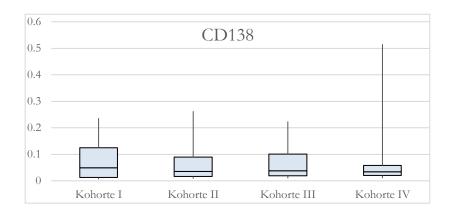


Abbildung 28: Anteil CD138-positiver Plasmazellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 33: Mittelwert und Median des Anteils CD138-positiver Plasmazellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	$0,083 \pm 0,077$	0,080 ± 0,079	$0,075 \pm 0,062$	0,109 ± 0,142
Median	0,059	0,045	0,054	0,054

Mit einer Spearman-Rangkorrelation wurde überprüft, ob die Anzahl CD138-positiver Plasmazellen positiv oder negativ mit der Anzahl anderer Zellen korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 34 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Alle Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD138 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 34: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD138

	MCT	CD4	CD80	CD40
Korrelationskoeffizient	0,384	0,244	0,574	0,318
Signifikanz	0,001	0,050	0,000	0,006

# 3.2.8 Mast Cell Tryptase (MCT)

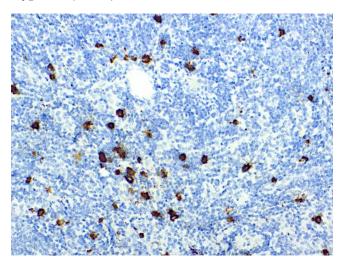


Abbildung 29: Färbeergebnis MCT mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung, die vielfach granulär vorlag. Die Farbintensität des Antikörpers war stark (siehe Abbildung 29). Die Mastzellen befanden sich interfollikulär. Es waren keine unspezifischen Hintergrundfärbungen erkennbar. Insgesamt waren zwölf Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei allen Schnitten zeigte sich eine positive Anfärbung.

Tabelle 35: Protokoll des Färbeergebnisses MCT

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	0
II (28)	8	0,28	3	3	0
III (22)	3	0,13	4	4	0
IV (15)	1	0,06	7	7	0
Gesamt (77)	12	0,17	14	14	0

Die Anzahl der zur Auswertung von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte war vermindert, da Tumorgewebe ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht eindeutig als solches identifiziert werden konnte, das im LK enthaltene Tumorgewebe zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I enthielt aufgrund der sehr geringen Tumorlast keine auswertbaren Schnitte und fiel deshalb aus der Auswertung heraus. Die meisten auswertbaren Schnitte waren in Kohorte IV zu finden (siehe Tabelle 35). Die Scores für TA und TI in den Kohorten II-IV waren gering (Score < 1; siehe Abbildungen 30 und 31). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten.

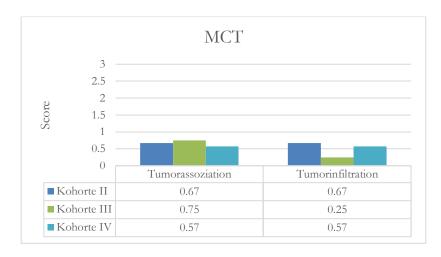


Abbildung 30: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI MCT-positiver Mastzellen in den Kohorten II-IV.

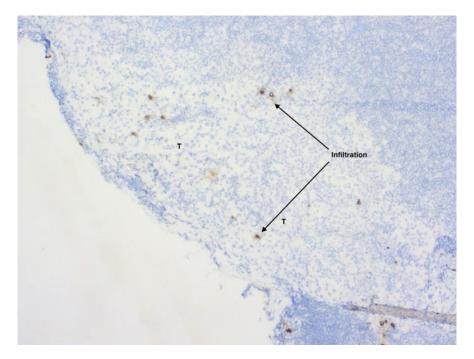


Abbildung 31: TI MCT-positiver Mastzellen. In diesem Präparat mit hoher Tumorlast zeigte sich eine geringe Tumorinfiltration (Score 1) und eine Tumorassoziation war nicht vorhanden (Score 0).

Der Box-Plot in Abbildung 32 zeigt den Anteil angefärbter MCT-positiver Mastzellen an der Gesamt-Zellzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten: Die Zellzahl in den Kohorten III und IV war signifikant vermindert gegenüber der Kohorte II (p = 0.035, p = 0.046). Mittelwerte und Mediane des CD138-positiv angefärbten Zellanteils der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 36 dargestellt.

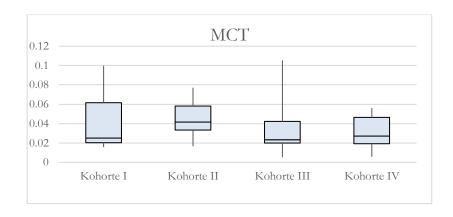


Abbildung 32: Anteil MCT-positiver Mastzellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 36: Mittelwert und Median des Anteils MCT-positiver Mastzellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	$0,041 \pm 0,032$	0,044 ± 0,017	$0,035 \pm 0,028$	0,031 ± 0,016
Median	0,025	0,042	0,023	0,027

Um zu vergleichen, ob ein Anstieg MCT-positiver Mastzellen positiv oder negativ mit anderen Antikörpern des Panels korrelierte, wurde eine Rangkorrelation nach Spearman angewendet. Dabei ergaben sich die in Tabelle 37 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Die Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg MCT-positiver Mastzellen mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 37: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von MCT

	CD138	CD57	CD1a	CD68	CD80	CD40
Korrelationskoeffizient	0,384	0,336	0,241	0,323	0,262	0,256
Signifikanz	0,001	0,004	0,048	0,008	0,033	0,031

# 3.3 TH2-polarisierte T-Helferzellen

#### 3.3.1 CD4

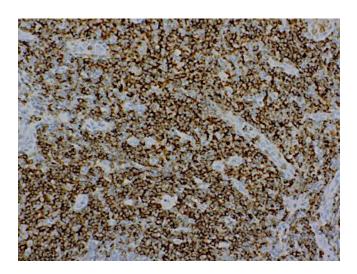


Abbildung 33: Färbeergebnis CD4 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplastmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war in den meisten Fällen stark, vereinzelt aber auch schwach ausgeprägt (siehe Abbildung 33). Teilweise waren unspezifische Hintergrundfärbungen erkennbar. Diese hatten aber keinen Einfluss auf die Auswertung. Insgesamt waren 13 Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei neun Schnitten zeigte sich keine Anfärbung.

Tabelle 38: Protokoll des Färbeergebnisses CD4

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	1
II (28)	6	0,21	4	4	4
III (22)	4	0,18	3	3	3
IV (15)	2	0,13	6	6	1
Gesamt (77)	13	0,16	13	13	9

Die Anzahl der zur Analyse von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte war gering, da tumorinfiltrierte Areale des LK ohne tumorspezifische Färbung nicht mehr erkennbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten waren. Kohorte I enthielt keine auswertbaren Fälle und fiel deshalb aus der Auswertung heraus.

Die meisten auswertbaren Fälle waren in Kohorte IV zu finden (siehe Tabelle 38). Die TA fiel am höchsten in Kohorte IV aus, war allerdings mit einem mittleren Score von 1 dennoch gering. Der Unterschied gegenüber den Kohorten II und III war gering und nicht signifikant. Auch die TI fiel in den Kohorten III und IV gering (Score <1) aus und in Kohorte II war keine TI festzustellen. Die leichten Unterschiede zwischen den Kohorten waren statistisch nicht signifikant (siehe Abbildungen 34 und 35).

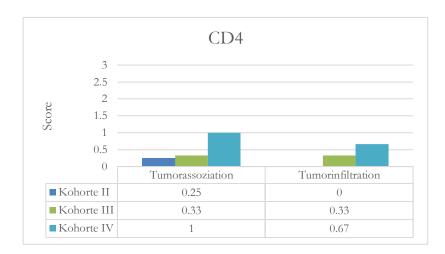


Abbildung 34: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD4-positiver T-Helferzellen in den Kohorten II-IV.

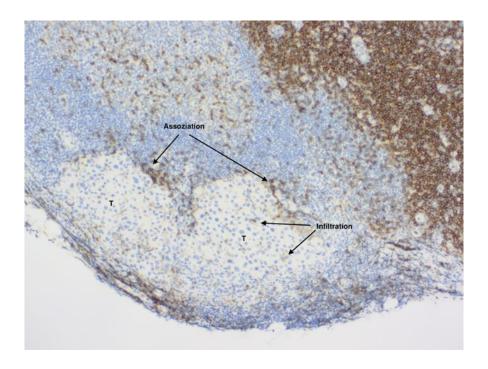


Abbildung 35: TA und TI CD4-positiver T-Helferzellen. In diesem Präparat mit hoher Tumorlast zeigten sich eine deutliche Tumorassoziation (Score 2) und eine geringe Tumorinfiltration (Score 1).

Der Box-Plot in Abbildung 36 zeigt den Anteil angefärbter CD4-positiver T-Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikante Unterschiede: Die Zellzahl in Kohorte I war signifikant erhöht gegenüber Kohorte II (p = 0.009). Kohorte I war ebenfalls gegenüber den Kohorten III und IV erhöht, wobei diese Erhöhung allerdings nicht statistisch signifikant war. Mittelwerte und Mediane des Anteils CD4-positiver Zellen an der Anzahl aller Zellen der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 39 dargestellt.

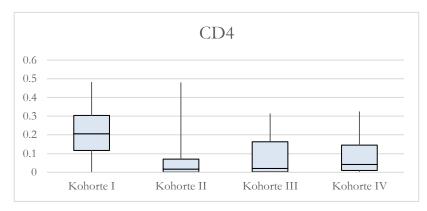


Abbildung 36: Anteil CD4-positiver T-Helferzellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 39: Mittelwert und Median des Anteils CD4-positiver T-Helferzellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	$0,209 \pm 0,149$	$0,073 \pm 0,128$	0,095 ± 0,111	$0,096 \pm 0,108$
Median	0,207	0,018	0,020	0,043

Um zu vergleichen, ob ein Anstieg CD4-positiver Zellen negativ oder positiv mit anderen Antikörpern des Panels korrelierte, erfolgte eine Rangkorrelation nach Spearman. Die Spearman-Rangkorrelation ergab mehrere statistische Signifikanzen (siehe Tabelle 40). Die Korrelationskoeffizienten waren zumeist positiv, sodass ein Anstieg von CD4 mit einem Anstieg des jeweiligen Antikörpers verbunden war. Im Falle von iNOS lag eine negative Korrelation vor, sodass ein Anstieg CD4-positiver T-Zellen zu einer Verminderung von iNOS führte.

Tabelle 40: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD4

	CD138	CD56	CD68	CD8	Gata3	iNOS	CD80	CD40
Korrelationskoeffizient	0,244	0,571	0,324	0,608	0,314	-0,262	0,269	0,380
Signifikanz	0,05	0,000	0,007	0,000	0,008	0,035	0,026	0,001

# 3.3.2 GATA3

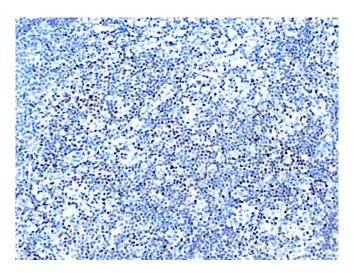


Abbildung 37: Färbeergebnis GATA3 mit dem DAKO Omnis, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine nukleare Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war schwach bis moderat (siehe Abbildung 37). Es waren keine unspezifischen Hintergrundfärbungen vorhanden. Insgesamt waren acht Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Neun Schnitte zeigten keine Anfärbung.

Tabelle 41: Protokoll des Färbeergebnisses GATA3

Kohorte	Abgeschwemmte	Abgeschwemmte	Tumor-	Tumor-	Keine
(Fallanzahl)	Fälle (Anzahl)	Fälle (Anteil)	assoziation	infiltration	Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	1
II (28)	4	0,14	3	3	3
III (22)	1	0,04	5	5	3
IV (15)	2	0,13	6	6	2
Gesamt (77)	8	0,10	14	14	9

Die Anzahl der zur Bewertung von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte war vermindert, weil das Tumorgewebe ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht erkennbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I fiel wegen fehlender auswertbarer Schnitte aus der Auswertung heraus (siehe Tabelle 41). Sowohl TA als auch TI konnten in den Kohorten III und IV in geringem Ausmaß festgestellt werden (Score < 1). Kohorte II zeigte sehr geringe TA und TI war nicht festzustellen (siehe Abbildungen 38 und 39).

Die Unterschiede zwischen den Kohorten II, III und IV waren nach dem Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant.

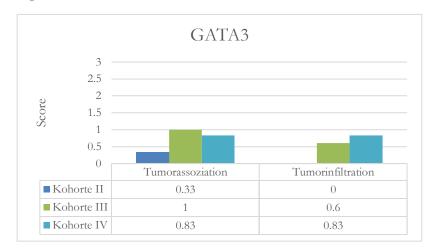


Abbildung 38: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI GATA3-positiver Zellen in den Kohorten II-IV.

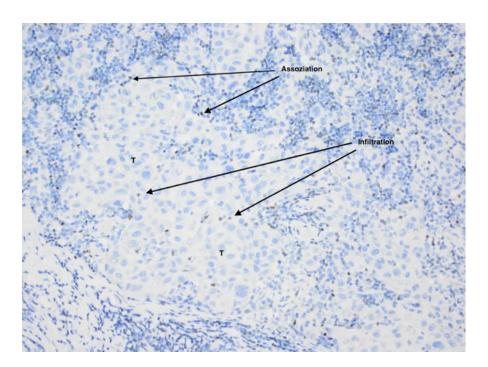


Abbildung 39: TA und TI GATA3-positiver Zellen. In diesem Präparat mit hoher Tumorlast zeigte sich eine geringe Tumorassoziation (Score 1) und eine geringe Tumorinfiltration (Score 1).

Der Box-Plot in Abbildung 40 zeigt den Anteil angefärbter GATA3-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikante Unterschiede: Die Zellzahl in Kohorte I war signifikant erhöht gegenüber den Kohorten II und III (p = 0.026, p = 0.004).

Mittelwerte und Mediane des Anteils GATA3-positiver Zellen an der Gesamt-Zellzahl der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 42 dargestellt.

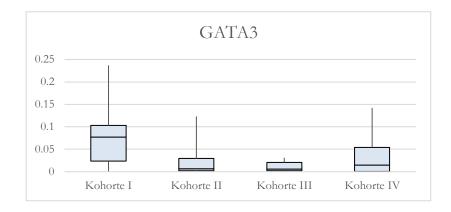


Abbildung 40: Anteil GATA3-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 42: Mittelwert und Median des Anteils GATA3-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,079 ± 0,068	$0,025 \pm 0,038$	0,011 ± 0,011	$0,034 \pm 0,042$
Median	0,077	0,006	0,006	0,015

Mit einer Spearman-Rangkorrelation wurde überprüft, ob ein Anstieg von GATA3 positiv oder negativ mit anderen Antikörpern korrelierte. Dabei ergaben sich mehrere statistische Signifikanzen (siehe Tabelle 43). Die Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von GATA3 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 43: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von GATA3

	CD1a	CD68	CD20	CD8	CD4	CD25	CD40	IDO
Korrelationskoeffizient	0,393	0,387	0,258	0,246	0,314	0,318	0,533	0,482
Signifikanz	0,001	0,001	0,026	0,039	0,008	0,006	0,000	0,000

# 3.4 Kostimulatorische Moleküle antigenpräsentierender Zellen

## 3.4.1 CD40

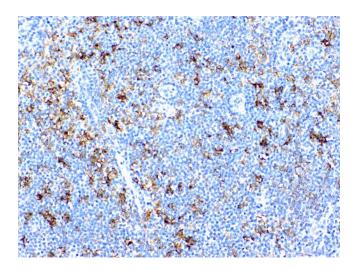


Abbildung 41: Färbeergebnis CD40 mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war moderat bis stark (siehe Abbildung 41). Teilweise waren unspezifische Hintergrundfärbungen ohne Einfluss auf die Auswertung erkennbar. Insgesamt waren drei Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei allen Schnitten zeigte sich eine positive Anfärbung.

Tabelle 44: Protokoll des Färbeergebnisses CD40

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	0
II (28)	3	0,10	3	3	0
III (22)	0	0	6	6	0
IV (15)	0	0	7	7	0
Gesamt (77)	3	0,04	16	16	0

Die Anzahl der zur Bewertung von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte war vermindert, weil das Tumorgewebe ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht erkennbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I enthielt wegen der sehr kleinen Tumorlast keine auswertbaren Paraffinschnitte (siehe Tabelle 44). TA konnte in den Kohorten II, III und IV festgestellt werden.

Kohorte III zeigte einen geringen Score < 1 und die Kohorten II und IV zeigten im Mittel eine zirkuläre Assoziation von 26-50 %. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Die TI war in den Kohorten II und IV sehr gering (Score < 1) und Kohorte III wies keine TI auf. Die Unterschiede waren nicht signifikant (siehe Abbildungen 42 und 43).

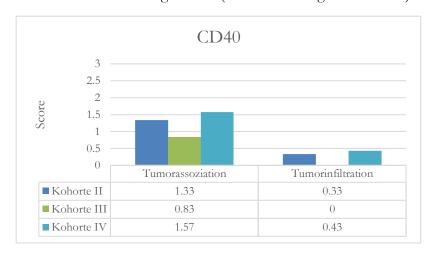


Abbildung 42: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD40-positiver Zellen in den Kohorten II-IV.

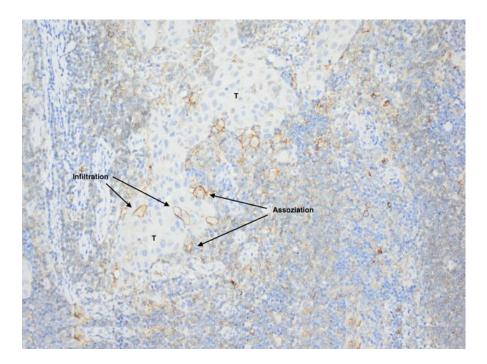


Abbildung 43: TA und TI CD40-positiver Zellen. In dem Präparat mit hoher Tumorlast zeigte sich eine deutliche Tumorassoziation (Score 2) und eine geringe Tumorinfiltration (Score 1).

Der Box-Plot in Abbildung 44 zeigt den Anteil angefärbter CD40-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Zellanzahl. Mittelwerte und Mediane des positiv angefärbten Zellanteils der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 45 dargestellt.

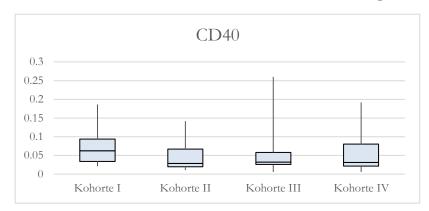


Abbildung 44: Anteil CD40-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 45: Mittelwert und Median des Anteils CD40-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	$0,072 \pm 0,050$	0,046 ± 0,036	$0,052 \pm 0,057$	$0,064 \pm 0,057$
Median	0,062	0,029	0,032	0,031

Mit einer Spearman-Rangkorrelation sollte überprüft werden, ob ein Anstieg der Zellanzahl CD40-positiver Zellen positiv oder negativ mit anderen Antikörpern des Panels korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 46 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Die Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von CD40 demnach mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war.

Tabelle 46: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD40

	CD138	MCT	CD68	CD20	CD8	CD4	Gata3	CD25	CD80	IDO
Korrelations- koeffizient	0,318	0,256	0,314	0,225	0,271	0,380	0,533	0,453	0,370	0,293
Signifikanz	0,006	0,031	0,006	0,046	0,020	0,001	0,000	0,000	0,001	0,011

#### 3.4.2 CD80

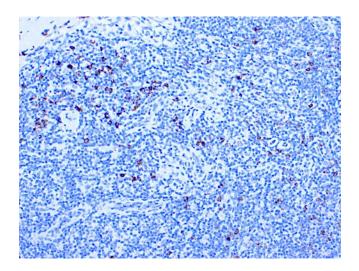


Abbildung 45: Färbeergebnis CD80 mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war moderat bis stark (siehe Abbildung 45). Teilweise waren leichte unspezifische Hintergrundfärbungen ohne Einfluss auf die Auswertung erkennbar. Insgesamt waren zehn Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei zwölf Schnitten zeigte sich keine Anfärbung.

Tabelle 47: Protokoll des Färbeergebnisses CD80

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	3
II (28)	4	0,14	4	4	4
III (22)	2	0,09	3	3	3
IV (15)	4	0,26	6	6	2
Gesamt (77)	10	0,13	13	13	12

Die Auswertung von TA und TI war eingeschränkt, da das angeschnittene Tumorgewebe in einigen Paraffinschnitten zu klein war, um es ohne tumorspezifische Immunfärbung zu erkennen, oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I fiel wegen der sehr geringen Tumorlast aus der Auswertung heraus (siehe Tabelle 47). Die TA CD80-positiver Zellen war in den Kohorten II und IV sehr gering (Score < 1) und Kohorte III zeigte keine TA. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Auch TI zeigte sich nur sehr vereinzelt in geringem Ausmaß in den Kohorten III und IV (Score < 1) und die Kohorte II zeigte keine TI. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant (siehe Abbildungen 46 und 47).

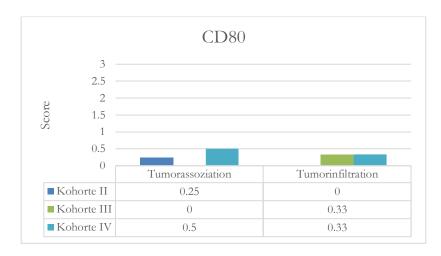


Abbildung 46: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI CD80-positiver Zellen in den Kohorten II-IV.

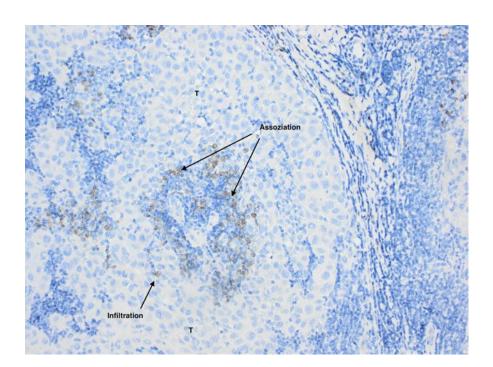


Abbildung 47: TA und TI CD80-positiver Zellen. In diesem Präparat mit hoher Tumorlast zeigte sich eine geringe Tumorassoziation (Score 1) und eine geringe Tumorinfiltration (Score 1).

Der Box-Plot in Abbildung 48 zeigt den Anteil angefärbter CD80-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *botspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede. Mittelwerte und Mediane des Anteils CD80-positiver Zellen der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 48 dargestellt.

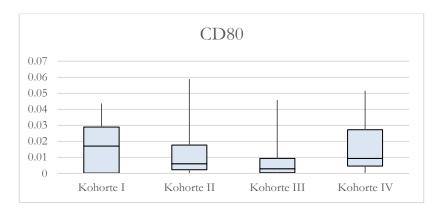


Abbildung 48: Anteil CD80-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 48: Mittelwert und Median des Anteils CD80-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,018 ± 0,017	0,013 ± 0,016	0,008 ± 0,018	0,016 ± 0,018
Median	0,017	0,006	0,003	0,009

Mit einer Spearman-Rangkorrelation sollte überprüft werden, ob ein Anstieg CD80-positiver Zellen positiv oder negativ mit anderen Antikörpern des Panels korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 49 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Die positiven Korrelationskoeffizienten weisen darauf hin, dass ein Anstieg von CD80 mit einem Anstieg des jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Antikörpers verbunden war. Im Falle von iNOS ergab sich eine negative Korrelation, sodass ein Anstieg von CD80 demnach mit einer Verminderung von iNOS korrelierte.

Tabelle 49: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von CD80

	CD138	MCT	CD4	iNOS	CD25	CD40	IDO
Korrelationskoeffizient	0,574	0,262	0,269	-0,253	0,288	0,370	0,243
Signifikanz	0,000	0,033	0,026	0,037	0,015	0,001	0,039

## 3.5 Induzierbare Stickstoffmonooxid-Synthase

#### 3.5.1 iNOS

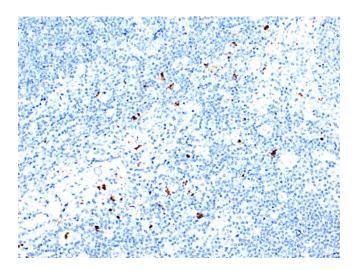


Abbildung 49: Färbeergebnis iNOS mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine zytoplasmatisch-membranöse Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers war schwach bis moderat. Die meisten Paraffinschnitte zeigten nur wenige positiv angefärbte Zellen, die weit verstreut waren (siehe Abbildung 49). Teilweise gab es unspezifische Hintergrundfärbungen ohne Auswirkung auf die Auswertung. Insgesamt waren 14 Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei zwölf Schnitten zeigte sich keine Anfärbung.

Tabelle 50: Protokoll des Färbeergebnisses iNOS

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	1	0,08	0	0	4
II (28)	7	0,25	1	1	3
III (22)	3	0,13	3	3	2
IV (15)	3	0,2	6	6	3
Gesamt (77)	14	0,18	10	10	12

Die für die Auswertung von TA und TI geeigneten Paraffinschnitte waren dadurch limitiert, dass das im LK enthaltene Tumorgewebe im jeweiligen Schnitt entweder ohne tumorspezifische Immunfärbung nicht eindeutig erkennbar oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I enthielt wegen der sehr geringen Tumorlast keine auswertbaren Paraffinschnitte (siehe Tabelle 50). Die TA iNOS-positiver Zellen fiel in den Kohorten III und IV sehr gering aus (Score < 1) und in Kohorte II zeigte sich keine TA. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die TI war in den Kohorten III und IV ebenfalls gering (Score < 1) und Kohorte II zeigte keine TI. Die Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 50). Partiell wurde iNOS auch von Tumorgewebe exprimiert (siehe Abbildung 51).

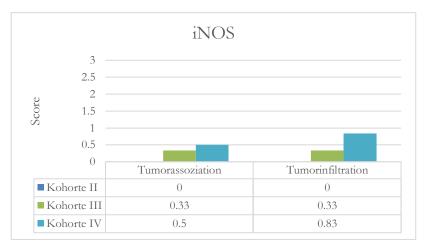
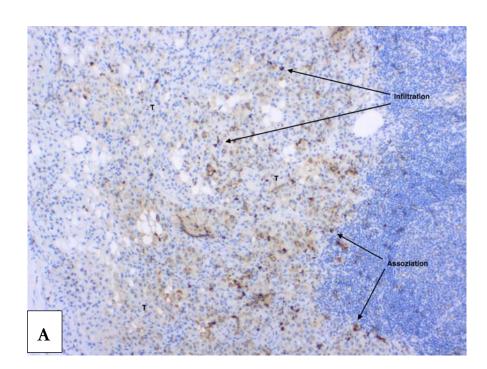


Abbildung 50: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI iNOS-positiver Zellen in den Kohorten II-IV.



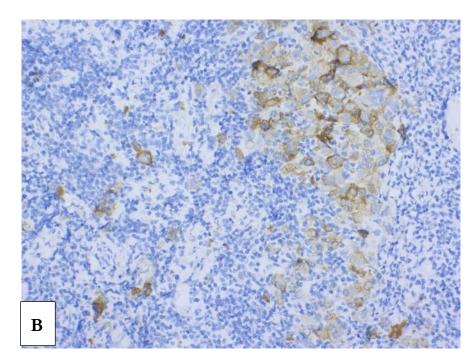


Abbildung 51: TA, TI und Expression von iNOS. A) Das Präparat mit hoher Tumorlast zeigte eine geringe zirkuläre Tumorassoziation (Score 1). Es zeigte sich eine deutliche Tumorinfiltration (Score 2) und eine partielle iNOS-Expression durch die Melanomzellen. B) Das Präparat mit geringer Tumorlast zeigte eine deutliche Expression von iNOS durch das Melanom.

Der Box-Plot in Abbildung 52 zeigt den Anteil angefärbter iNOS-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgenden signifikanten Unterschied: Die Zellzahl in Kohorte III war signifikant erhöht gegenüber Kohorte I (p = 0.045). Mittelwerte und Mediane des Anteils iNOS-positiver Zellen in den Kohorten I-IV werden in der Tabelle 51 dargestellt.

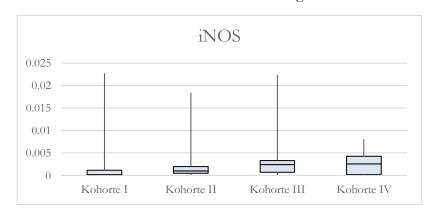


Abbildung 52: Anteil iNOS-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 51: Mittelwert und Median des Anteils iNOS-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	0,002 ± 0,007	0,002 ± 0,004	$0,003 \pm 0,005$	$0,003 \pm 0,003$
Median	0,0001	0,001	0,002	0,003

Um zu überprüfen, ob ein Anstieg iNOS-positiver Zellen positiv oder negativ mit anderen Antikörpern des Panels korrelierte, wurde eine Rangkorrelation nach Spearman erstellt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 52 dargestellten statistischen Signifikanzen. Die Korrelationskoeffizienten waren negativ, sodass ein Anstieg von iNOS demnach mit einer Verminderung der in der Tabelle aufgeführten Antikörper verbunden war.

Tabelle 52: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von iNOS

	CD4	CD80
Korrelationskoeffizient	-0,262	-0,253
Signifikanz	0,035	0,037

## 3.6 Indolamin 2,3-Dioxygenase

#### 3.6.1 IDO

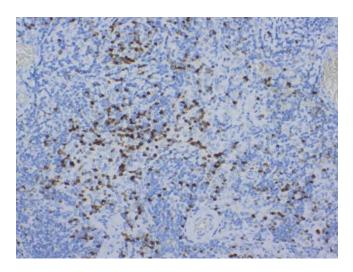


Abbildung 53: Färbeergebnis IDO mit dem DAKO Autostainer Link 48, hotspot ohne Tumoranschnitt.

Im Färbeergebnis zeigte sich eine membranöse, zytoplasmatische und nukleare Anfärbung. Die Farbintensität des Antikörpers variierte zwischen schwach, moderat und stark (siehe Abbildung 53). Teilweise waren leichte unspezifische Hintergrundfärbungen ohne Einfluss auf die Auswertung erkennbar. Insgesamt waren neun Färbungen abgeschwemmt, die deshalb aus der Auswertung herausgenommen wurden. Bei einem Schnitt zeigte sich keine Anfärbung.

Tabelle 53: Protokoll des Färbeergebnisses IDO

Kohorte (Fallanzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anzahl)	Abgeschwemmte Fälle (Anteil)	Tumor- assoziation	Tumor- infiltration	Keine Anfärbung
I (12)	0	0	0	0	0
II (28)	5	0,17	4	4	0
III (22)	2	0,09	5	5	1
IV (15)	2	0,13	6	6	0
Gesamt (77)	9	0,12	15	15	1

Die für die Auswertung von TA und TI verfügbare Anzahl geeigneter Paraffinschnitte war gering,, weil das Tumorgewebe oft nicht eindeutig identifizierbar, zu klein oder nicht mehr angeschnitten war. Kohorte I fiel mangels auswertbarer Schnitte aus der Auswertung heraus.

Die auswertbaren Paraffinschnitte waren gleichmäßig auf die Kohorten II-IV verteilt (siehe Tabelle 53). Die TA war in den Kohorten II-IV gering (Score < 1), im Mittel allerdings am höchsten in Kohorte IV. Es gab dem Mann-Whitney-U-Test zufolge keine signifikanten Unterschiede. Auch die Tumorinfiltration in den Kohorten II-IV war gering, wobei der Wert ebenfalls in Kohorte IV am höchsten lag. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 54 und 55). In einem Fall konnte eine moderate IDO-Expression durch das Tumorgewebe festgestellt werden (siehe Abbildung 55).

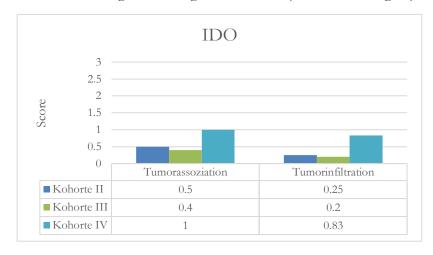
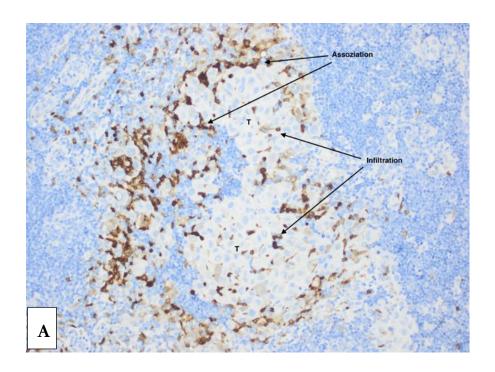


Abbildung 54: Mittelwerte der semiquantitativen Scores von TA und TI IDO-positiver Zellen in den Kohorten II-IV.



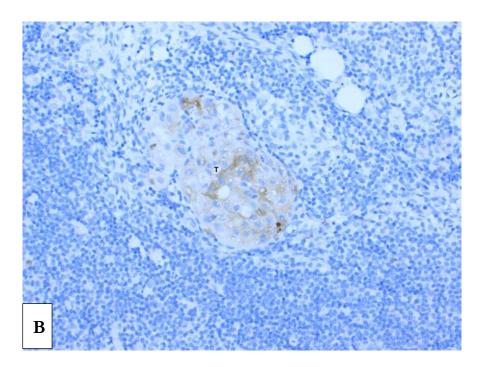


Abbildung 55: TA, TI und Expression von IDO. A) Das Präparat mit hoher Tumorlast zeigte eine deutliche Tumorassoziation (Score 2) und eine geringe Tumorinfiltration (Score 1). B) Das Präparat mit geringer Tumorlast zeigte eine moderate Expression von IDO durch die Melanomzellen.

Der Box-Plot in Abbildung 57 zeigt den Anteil angefärbter IDO-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den *hotspots* der Kohorten I-IV. Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende signifikanten Unterschiede: Die Zellzahl in den Kohorten I, II und IV war signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.004, p = 0.013, p = 0.000). Die Zellzahl in Kohorte IV war signifikant erhöht gegenüber der Kohorte II (p = 0.024). Bei einer Zusammenfassung der Kohorten I und II war IDO in ihnen signifikant erhöht gegenüber der Kohorten I, II und IV im Hinblick auf die Prognose war IDO in ihnen signifikant erhöht gegenüber der Kohorte III (p = 0.000). Mittelwerte und Mediane des Anteils IDO-positiver Zellen der Kohorten I-IV werden in der Tabelle 54 dargestellt.

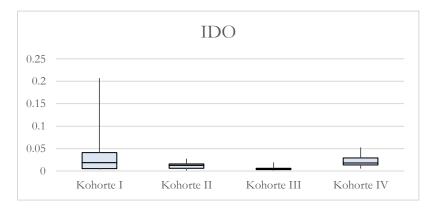


Abbildung 56: Anteil IDO-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV.

Tabelle 54: Mittelwert und Median des Anteils IDO-positiver Zellen an der Gesamt-Zellanzahl in den Kohorten I-IV

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III	Kohorte IV
Mittelwert ± s	$0,036 \pm 0,058$	0,012 ± 0,007	0,007 ± 0,006	$0,024 \pm 0,016$
Median	0,019	0,013	0,005	0,018

Mit einer Spearman-Rangkorrelation sollte überprüft werden, ob ein Anstieg von IDO positiv oder negativ mit anderen Antikörpern des Panels korrelierte. Dabei ergaben sich die in Tabelle 55 aufgeführten statistischen Signifikanzen. Die Korrelationskoeffizienten waren positiv, sodass ein Anstieg von IDO demnach mit einem Anstieg der in der Tabelle aufgeführten Antikörper verbunden war.

Tabelle 55: Signifikante Rangkorrelationen nach Spearman von IDO

	CD68	CD20	CD8	Gata3	CD25	CD80	CD40
Korrelationskoeffizient	0,377	0,289	0,268	0,482	0,289	0,243	0,293
Signifikanz	0,001	0,013	0,026	0,000	0,015	0,039	0,011

#### 4 Diskussion

Die Reaktion des Immunsystems auf das maligne Melanom und seine Metastasen wurde bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten und Publikationen untersucht. Dennoch sind die komplexen immunologischen Prozesse innerhalb des Lymphknotens noch unverstanden und nicht ausreichend erforscht. Im Rahmen dieser Dissertation wurden positive SLK in vier unterschiedliche Kohorten eingeteilt, um die Immunreaktion innerhalb des Lymphknotens genauer zu charakterisieren und in den aktuellen wissenschaftlichen Konsens einzuordnen.

# 4.1 Immunzellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort

Da zytotoxische T-Zellen (ZTL) Tumorzellen direkt erkennen und eliminieren können, wird CD8 seit Dekaden in der Melanom-Forschung als Marker eingesetzt. ZTL können Melanomzellen durch eine MHC-I vermittelte Bindung tumorspezifischer Antigene gezielt töten (Mahnke et al. 2012). Da viele Melanomzellen MHC-I exprimieren, ist diese Abwehrmethode potent (Kim und Cantor 2014). Verschiedene Autoren haben die Anzahl von ZTLs in SLK untersucht. So waren die ZTLs sowohl in positiven als auch in negativen SLKs vermindert gegenüber gesunden LKs (Mansfield et al. 2011; Grotz et al. 2015). Nach diesen Autoren sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Tumorzellen nicht nur lokal im Lymphknoten immunsupprimierend wirken, sondern bereits vor der eigentlichen Tumorzellinfiltration im Lymphknoten eine Verschiebung in der Richtung eines immunsuppressiven Milieus stattfindet. Die Einteilung positiver SLKs in Kohorten anhand der klinischen Parameter Tumorlast und Prognose führte zu keinen signifikanten Unterschieden bei der Anzahl der in den Lymphknoten vorkommenden ZTLs (siehe Abbildung 5). Es konnte also nicht gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl von ZTLs im Lymphknoten mit einer geringen Tumorlast oder mit einer guten Prognose korreliert. Auch andere Autoren fanden keine Korrelation zwischen der Anzahl der ZTLs im SLK und der Prognose (Ali et al. 2014; Messaoudene et al. 2015). Es scheint also nicht die Anzahl der ZTLs im SLK von prognostischer Relevanz zu sein, sondern vielmehr ihr Vermögen, den Tumor zu infiltrieren. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass eine erhöhte Infiltration CD8-positiver Lymphozyten im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe mit einer verbesserten Prognose verbunden ist (Barbour und Coventry 2003; Erdag et al. 2012; Kakavand et al. 2015). Es konnten in den Kohorten II-IV eine sehr deutliche Assoziation (Score 2) und eine Infiltration (Score 1) von ZTLs beobachtet werden (siehe Abbildung 4). Deshalb kann diesem Phänomen sicherlich eine immunfunktionelle Bedeutung zugeschrieben werden. Signifikante Unterschiede hinsichtlich Tumorinfiltration und assoziation zwischen den Kohorten konnten allerdings nicht nachgewiesen werden.

Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass die ZTL-spezifische Tumorsuppression MHC-I-abhängig ist und mögliche Unterschiede bei der MHC-I-Expression des Tumorgewebes in den Kohorten I-IV partiell für Unterschiede bei der Tumorlast und der Prognose verantwortlich sein könnten. Außerdem war die semiquantitative Auswertung der Kohorten mit geringer Tumorlast limitiert durch den geringen Durchmesser des Tumoranschnitts, was möglicherweise einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

CD20 ist ein Antigen, das spezifisch von B-Zellen exprimiert wird. B-Zellen präsentieren Antigene und bilden sich bei der Aktivierung zu Plasmazellen aus, die dann spezifische Antikörper herstellen. Deshalb spielen sie eine zentrale Rolle bei der spezifischen Immunabwehr. In Bezug auf das maligne Melanom zeigte sich beim Vergleich von Lymphknoten gesunder Patienten und SLKs eine signifikante Erhöhung von CD20 in den Lymphknoten von Patienten mit malignem Melanom (Grotz et al. 2015). Die Einteilung positiver SLKs in die sich hinsichtlich Tumorlast und Prognose unterscheidenden Kohorten I-IV ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl CD20-positiver B-Zellen im Lymphknoten (siehe Abbildung 9). Es waren zwar im Vergleich mit den anderen Färbungen bemerkenswert viele positiv angefärbte Zellen vorhanden, was aber durchweg in allen Kohorten auftrat und möglicherweise als Zeichen einer durch die Metastasierung hervorgerufenen chronischen Entzündung interpretiert werden kann. Es waren auch eine eindeutige Tumorinfiltration und -assoziation zu beobachten (siehe Abbildung 8). Die Kohorte mit geringer Tumorlast und schlechter Prognose (Kohorte III) zeigte eine signifikant geringere Infiltration CD20-positiver B-Zellen im Vergleich mit der Kohorte mit großer Tumorlast und guter Prognose (Kohorte IV). Im Unterschied zu den Ergebnissen von Barbour und Coventry, die zwar ebenfalls in SLKs tumorinfiltrierende B-Zellen fanden, die aber ohne prognostische Bedeutung waren (Barbour und Coventry 2003), belegen die vorliegenden Ergebnisse zumindest eine tendenziell positiv prognostische Bedeutung für tumorinfiltrierende B-Zellen. B-Zellen können allerdings vermutlich nicht das Metastasenwachstum als solches einschränken. Dennoch könnte der Unterschied in der Tumorlast von Kohorte IV auch auf ein zeitlich bedingtes und fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung zurückzuführen sein.

CD56 ist ein spezifisch von natürlichen Killerzellen exprimiertes Antigen. Die Anzahl der NK-Zellen war signifikant erhöht in der Patientenkohorte III mit kleiner Tumorlast und schlechter Prognose im Vergleich mit den Kohorten I, II und IV (siehe Abbildung 12). Es wurde zwar bereits beschrieben, dass sich in SLKs etwa doppelt so viele NK-Zellen nachweisen lassen wie in gesunden LKs (Ali et al. 2014), aber es wurde bisher nicht beschrieben, dass gerade die SLKs mit besonders hoher CD56-Expression eine verminderte Prognose zu haben scheinen. Tumorinfiltration und -assoziation von NK-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen anderer Autoren deckt (Barbour und Coventry 2003; Messaoudene et al. 2014). Die erhöhte Anzahl CD56-positiver NK-Zellen scheint daher nicht in einem direkten Zusammenhang mit der immunologischen Tumorbekämpfung zu stehen,

sekundär als Zeichen kann möglicherweise eher einer Entzündungsreaktion des Immunsystems auf den aggressiven Tumor interpretiert werden. Es ist auch möglich , dass besonders aggressive Formen des Melanoms die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen inhibieren bzw. inaktivieren können. Dadurch würden dann weitere NK-Zellen rekrutiert. Weiterhin kann CD56 in die Subtypen dim und bright unterteilt werden, die sich in der Zytotoxizität, der Reifung und dem Vorkommen voneinander unterscheiden (Ali et al. 2014; Messaoudene et al. 2014). Die Kohorten mit guter Prognose könnten dann den stark zytotoxischen reifen Subtyp dim exprimieren, der bereits in tumorinfiltrierten LKs nachgewiesen wurde (Ali et al. 2014). In der Kohorte III könnten zwar deutlich mehr NK-Zellen exprimiert werden, allerdings vom weniger effektiven Subtyp bright, der sich tendenziell eher in gesunden LKs findet. Insgesamt war die Anzahl positiver Zellen in allen LKs aber sehr gering, wodurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert wurde.

CD57 ist primär ein Marker, der mit der Zellreifung CD8-positiver und CD56-positiver zytotoxischer T-Zellen bzw. natürlicher Killerzellen in Verbindung gebracht wird. Diese reifen zytotoxischen T-Zellen bzw. natürlichen Killerzellen weisen eine hohe zytolytische Aktivität auf und sind daher potente antitumorale Effektorzellen (Brenchley et al. 2003; Björkström et al. 2010). Der Vergleich zwischen positiven und negativen SLKs zeigte eine erhöhte Expression CD57-positiver Lymphozyten in den Keimzentren positiver SLKs (Petrini et al. 2012), was auch beim Vergleich positiver SLKs mit gesunden LKs auftrat (Ali et al. 2014). Die Kohorten II und IV mit guter Prognose, die sich in der Tumorlast deutlich unterschieden, exprimierten signifikant mehr CD57-positive Zellen als die Patientenkohorte III mit geringer Tumorlast und schlechter Prognose (siehe Abbildung 16). Eine erhöhte Anzahl terminal differenzierter zytotoxischer Effektorzellen bzw. NK-Zellen im SLK kann die Prognose anscheinend positiv durch eine gezielte Erkennung und Zerstörung Melanomspezifischer Antigene beeinflussen. In den Kohorten II und IV mit guter Prognose zeigte sich in einigen Fällen eine schwache Tumorassoziation zirkulär < 25 % (Score 1, siehe Abbildung 15), die signifikant höher war als in Kohorte III. Allerdings war die Fallzahl mit erkennbarer und auswertbarer Tumormasse in dieser Kohorte sehr gering, weshalb dieser Trend in weiteren Untersuchungen überprüft werden sollte. Eine recht geringe Anzahl infiltrierender CD57-positiver Zellen (Score <1 ) war in den Kohorten II, III und IV zu finden. Entgegen der Erwartung gab es keine Unterschiede zwischen den Kohorten. In der Literatur finden sich keine Publikationen zu melanom-assoziierten oder -infiltrierten CD57positiven Zellen.

CD68 ist der primäre Marker für Makrophagen. Messaoudene et al. konnte bereits nachweisen, dass CD68 im Vergleich mit negativen SLKs verstärkt in tumorpositiven SLKs auftrat. Die CD68-positiven Makrophagen sammelten sich zumeist subkapsulär (Messaoudene et al. 2015). Auch Grotz et al. stellten fest, dass CD68 in einem Vergleich mit gesunden LKs verstärkt in negativen SLKs vorkamen.

Daraus wurde abgeleitet, dass das immunologische Mikromilieu des LKs bereits vor der Metastasierung durch das Melanom verändert wird (Grotz et al. 2015). Für die positiven SLKs konnte in der vorliegenden Arbeit die höchste Konzentration CD68-positiver Makrophagen in der Patientenkohorte I nachgewiesen werden, die gegenüber der Kohorte III signifikant erhöht war. Auch bei einem Vergleich der Kohorten I, II und IV mit der Kohorte III im Hinblick auf die Prognose war die Konzentration CD68-positiver Makrophagen signifikant erhöht (siehe Abbildung 20). Dadurch wird die Annahme gestützt, dass eine erhöhte Anzahl von Makrophagen die Prognose verbessert, weil sie als Effektorzellen der unspezifischen Immunantwort die Antigene infiltrierender Melanomzellen detektieren und zerstören können. Es könnte für eine Aktivierung der Makrophagen als eine initiale Antwort auf die Metastasierung im Rahmen der Entzündungsreaktion auf den Tumor sprechen, worauf bereits Grotz et al. hingewiesen haben (Grotz et al. 2015), dass die höchste Konzentration in der Patientenkohorte I zu finden war. In einer Studie zur Charakterisierung tumorinfiltrierender Immunzellen beim malignen Melanom wurden Makrophagen als vorwiegend infiltrierende Zellen beschrieben (Barbour und Coventry 2003). Es konnte aber auch eine Eignung zur Tumorassoziation nachgewiesen werden (Sica et al. 2006), was auch im Rahmen dieser Forschungsarbeit bestätigt werden konnte. Am deutlichsten waren die Tumorassoziation und -infiltration in Kohorte IV ausgeprägt mit mittleren Scores von 1,88 und 1,63 (siehe Abbildung 19). Ein signifikanter Unterschied gegenüber den Kohorten II und III war nicht vorhanden.

CD1a ist als Marker für dendritische Zellen, die als wichtigste antigen-präsentierende Zellen der unspezifischen Immunantwort zuzuschreiben sind (Steinman 2003), von zentraler Bedeutung. Es wurde daher bereits von verschiedenen Autoren untersucht, ob sich die Konzentration dendritischer Zellen in SLKs und NSLKs voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse waren dabei teilweise widersprüchlich. Eine Forschungsgruppe konnte eine signifikante Verminderung der CD1a-Konzentration in SLKs nachweisen (Cochran et al. 2001), während eine andere eine signifikant erhöhte Konzentration in SLKs beschrieb (Botella-Estrada et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Patientenkohorte I die höchste Konzentration dendritischer Zellen und die Patientenkohorte IV zeigte die niedrigste. Der Unterschied zwischen den beiden Kohorten war signifikant. Die Kohorten II und III hatten ebenfalls eine höhere Konzentration, wobei dieser Unterschied aber nicht signifikant war (siehe Abbildung 24). Dendritische Zellen scheinen also prognostisch nicht ausschlaggebend zu sein, man kann aber annehmen, dass ihnen eine Rolle beim Zurückhalten der Tumorlast zukommt. Die verminderte Zellanzahl bei höherer Tumorlast könnte aber auch darauf verweisen, dass der Tumor die dendritischen Zellen verdrängt oder zerstört, was dadurch gestützt wird, dass sie kaum im Tumor zu finden waren. Die dendritischen Zellen könnten aber auch im zeitlichen Verlauf der Krankheit aus dem LK emigrieren, wenn man annimmt, dass eine hohe Tumorlast bei der Lymphknotenentnahme auf einen späteren therapeutischen Eingriff und damit auf ein fortgeschrittenes Stadium zurückzuführen ist. Tumorassoziation und -infiltration konnten kaum festgestellt werden.

Abgesehen von der Assoziation in Kohorte II (Score 1,25) lag der mittlere Score unter 1. Es ergaben sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten II-IV. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderen Autoren, die zwar dendritische Zellen zahlreich im Lymphknoten fanden, von denen aber nur sehr wenige in den Tumor infiltrierten (Barbour und Coventry 2003). In einem Fall wurde CD1a durch das Tumorgewebe exprimiert, was bisher zwar von anderen Tumoren bekannt ist, wie Magenkrebs und Urothelkarzinom (proteinatlas.org), aber beim Melanom bisher noch nicht beschrieben wurde (siehe Abbildung 23). Es ist aber auch möglich, dass es sich in diesem Fall um eine überbordende Melaninbildung handelte, die eine Immunfärbung suggerierte.

CD138 ist als Marker für Plasmazellen in der immunpathologischen Diagnostik sehr wichtig. Über die Bedeutung von Plasmazellen in positiven oder negativen SLKs beim malignen Melanom finden sich in der Literatur allerdings kaum Daten. Es wurde zwar bereits die prognostische Bedeutung tumorinfiltrierender Plasmazellen sowohl bei primären Melanomen (Bosisio et al. 2016) als auch bei Melanommetastasen in Lymphknoten (Erdag et al. 2012) untersucht, aber die Unterschiede im Milieu positiver oder negativer SLKs oder NSLKs wurden bisher noch nicht untersucht. Auch wenn man annehmen könnte, dass eine erhöhte Anzahl von melanom-spezifischen und Antikörper bildenden Plasmazellen mit einer besseren Prognose verbunden sein sollte, ergaben die vorliegenden Ergebnisse keine Korrelationen innerhalb der Kohorten (siehe Abbildung 28). Die Ergebnisse zeigten keine tumorinfiltrierenden Plasmazellen in den Kohorten II und III, aber in der Kohorte IV traten Tumorassoziation und Tumorinfiltration mit einem mittleren Score von je > 1 auf. Dieser Unterschied war signifikant. Eine höhere Tumordicke korrelierte demnach mit der Anzahl infiltrierender und assoziierter Plasmazellen. Andere Autoren fanden diese Korrelation auch beim primären Melanom und leiteten daraus ab, dass eine hohe Anzahl infiltrierender Plasmazellen mit einer schlechten Prognose korreliert (Bosisio et al. 2016). Diese Annahme kann man hinsichtlich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zumindest anzweifeln, da diese Korrelation auch bei Patienten mit guter Prognose auftrat. Eine erhöhte Plasmazellinfiltration spricht zwar dafür, dass der Tumor aktiv vom Immunsystem erkannt und bekämpft wird, und man kann auch annehmen, dass die Plasmazellen tumorspezifische Antikörper bilden. Dennoch ist die prognostische Bedeutung eher schwach, da auch die Kohorte II ohne deutliche Plasmazellbeteiligung eine gute Prognose aufwies.

MCT dient als Marker für Mastzellen. Mastzellen zeichnen sich vor allem durch die Freisetzung einer Vielzahl unterschiedlicher Chemokine, Zytokine und Enzyme aus, weshalb sie eine komplexe Rolle im Immunsystem spielen. So wirken Mastzellen bei der Aktivierung durch Degranulation antitumoral, indem sie proinflammatorisch werden und Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort rekrutieren, wie B- und T-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Sie fördern aber durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Matrix-Metalloproteasen auch das Tumorwachstum und die Metastasierung (Komi und Redegeld 2019). Ein Vergleich der Mastzellanzahl bei positiven vs. negativen SLKs bzw. SLKs vs. NSLKs ist in der Literatur nicht zu finden.

Die Analyse positiver SLKs anhand von vier Kohorten in der vorliegenden Arbeit konnte den größten Anteil von Mastzellen im LK bei Patienten mit geringer Tumorlast und guter Prognose nachweisen (Kohorte II). Diese Kohorte enthielt signifikant mehr Mastzellen im LK als die Kohorten III und IV mit geringer Tumorlast und schlechter Prognose und hoher Tumorlast und guter Prognose (siehe Abbildung 32). Man kann daher annehmen, dass bei erhöhter Mastzellanzahl im LK die Rekrutierung weiterer Immunzellen erfolgt, was sich dann positiv in der Prognose widerspiegelt (Vergleich Kohorte II und III). Allerdings war auch die Prognose in Kohorte IV gut, bei der signifikant weniger Mastzellen auftraten. Wegen der divergenten Eigenschaften von Mastzellen scheint die Kausalität hier also nicht so einfach zu sein, dass man dem linearen Anstieg der Zellanzahl eine direkte prognostische Aussagekraft zuordnen könnte. Ähnliches gilt für die Höhe der Tumorlast. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die verminderte Anzahl in Kohorte IV dadurch zu erklären ist, dass bei einer hohen Tumorlast die Mastzellen bereits degranuliert vorliegen, sodass man hier von sogenannten empty phantom cells sprechen kann (Siiskonen et al. 2015). Außerdem wurde darüber berichtet, dass die Mastzellzahl in Abhängigkeit vom Ort der Gewebeentnahme variiert (Weber et al. 2003), was auch für die untersuchten LKs relevant sein könnte. Die Tumorassoziation von Mastzellen war kaum ausgeprägt. Auch die Tumorinfiltration war in den Kohorten II-IV schwach mit einem mittleren Score von < 1 (siehe Abbildung 31). Bei beiden Vorgängen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten II-IV. Bisher gibt es keine Publikationen zur Mastzellinfiltration bei Melanommetastasen und Studien an Primärmelanomen führten zu Ergebnissen: So zeigte sich einerseits eine Korrelation zwischen Tumorinfiltration, Tumorprogression und Gefäßdichte, aber andererseits auch eine Korrelation zwischen Tumorinfiltration und positivem Krankheitsverlauf (Ladányi 2015).

# 4.2 TH2-polarisierte T-Helferzellen

T-Helferzellen sind von zentraler Bedeutung für das Immunsystem, weil sie nach der Antigenpräsentation durch Makrophagen oder dendritische Zellen spezifische Antigene des Melanoms erkennen können, was zu einer Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und zur Ausschüttung von Zytokinen führt. Auch die Aktivierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen ist eine wichtige Funktion von T-Helferzellen. Dabei wird die Bindung durch die Rezeptoren MHC-2 und CD4 vermittelt, wobei der letztere in der Immunhistochemie als spezifischer Marker für T-Helferzellen verwendet wird. T-Helferzellen kommen unterschiedlich polarisiert vor und abhängig von ihrer Polarität haben sie differente Funktionen. Einer dieser Subtypen ist der TH2-Subtyp, der wegen seines spezifischen Zytokin-Profils, das chronische Entzündungen begünstigt, im Verdacht steht, die Tumorprogression und die Metastasierung zu fördern. Als spezifischer Marker für den TH2-Subtyp dient der Transkriptionsfaktor GATA3.

Der Vergleich zwischen SLKs und gesunden LKs führte zu keinen Unterschieden bei der CD4-Konzentration, es ergab sich allerdings eine Verschiebung in der Richtung eines TH2-Ungleichgewichts im SLK durch eine TH1-Suppression (Grotz et al. 2015). Auch der Vergleich zwischen positiven und negativen SLKs führte zu keiner signifikanten Abweichung CD4-positiver Zellen (Mansfield et al. 2011). Beim charakterisierenden Vergleich positiver SLKs ergab sich in der vorliegenden Arbeit die höchste Konzentration von T-Helferzellen in der Patientenkohorte I, die eine sehr geringe Tumorlast und sehr gute Prognose aufwies. Interessanterweise war der Unterschied gegenüber der Patientenkohorte II am größten und auch statistisch signifikant. Ebenfalls am höchsten in der Kohorte I war die Konzentration GATA3-positiver Zellen. Hier war der Unterschied gegenüber der Kohorte III am größten, direkt gefolgt von der Kohorte II, wobei beide Unterschiede statistisch signifikant waren. Diese Ergebnisse sind sehr interessant, da die Patienten in Kohorte I eine außergewöhnlich gute Prognose hatten. Für die sehr geringe Tumorlast kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen kann sie Ausdruck einer frühen Erkennung und chirurgischen Therapie sein, sodass das immunologische Profil in dieser Kohorte also eine Momentaufnahme eines frühen Stadiums der Metastasierung sein kann. Zum anderen aber könnte man sie auch auf eine erfolgreiche immunologische Abwehr und möglicherweise sogar auf eine lokale Regression zurückführen. Die zweite These wird durch Untersuchungen von Tefany et al. unterstützt, die die immunologischen Prozesse von regressiven und nichtregressiven Primärmelanomen analysiert haben. Dabei kamen sie zum Schluss, dass die tumorinfiltrierenden CD4+-Zellen signifikant mit einer Tumorregression assoziiert sind (Tefany et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar kein Unterschied bei der Tumorinfiltration von T-Helferzellen in den Kohorten festgestellt werden. Dies lag aber vorwiegend an den sehr kleinen Metastasen, die in der Immunfärbung nicht mehr erkennbar oder nicht mehr angeschnitten waren. Es lässt sich zumindest vermuten, dass eine Erhöhung der Konzentration von T-Helferzellen im Lymphknoten auch mit einer erhöhten Tumorinfiltration verbunden ist. Die Befähigung von T-Helferzellen zur Tumorinfiltration konnte in der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung 39) und in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Barbour und Coventry 2003). Wenn man die Resultate in Kohorte I als eine zeitliche Momentaufnahme im Sinne einer frühen Lymphknotenentnahme deutet, dann kann man daraus ableiten, dass die Konzentration von T-Helferzellen im zeitlichen Verlauf des malignen Prozesses abnimmt. Möglicherweise exprimiert hier der größer werdende Tumor aktiv supprimierende Zytokine oder er aktiviert supprimierende Immunzellen, wie z. B. regulatorische T-Zellen (Viguier et al. 2004). Die hohe Konzentration GATA3-positiver Zellen in Kohorte I wirkt auf den ersten Blick irritierend, da er als Marker für den tumorprogressiven TH2-Subtyp gerade in der Kohorte mit der besten Prognose am stärksten exprimiert wurde. Da diese Zellen aber auch CD4 exprimieren, kann man annehmen, dass diese Signifikanz durch die allgemein erhöhte Konzentration von T-Helferzellen in Kohorte I zu erklären ist. Dafür spricht auch die positive Rangkorrelation nach Spearman zwischen CD4 und GATA3.

Für zukünftige Forschungen und eine weitere Charakterisierung der SLKs wäre es sinnvoll, neben CD4 und GATA3 auch den Marker T-bet zu untersuchen, der spezifisch für den TH1-Subtyp ist. Durch das Verhältnis zwischen GATA3 und T-bet könnte man genauere Rückschlüsse auf das tumorprogressive oder tumorsuppressive Mikromilieu innerhalb der Kohorten ziehen. Weiterhin sollte auch ein genauerer Fokus auf CD4 gerichtet werden, da dieses Antigen auch von Subtypen der T-Helferzellen exprimiert werden kann, wie z. B. den immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (Chen und Oppenheim 2011) und den aktivierten NK-Zellen (Bernstein et al. 2006). Die Tumorassoziation und -infiltration beim metastasierten Melanom wurden bereits von anderen Forschungsgruppen untersucht. Sie korrelierten mit einem prognostisch positiven Krankheitsverlauf (Barbour und Coventry 2003; Kakavand et al. 2015; Ladoire et al. 2016). Auch in dieser Arbeit konnte zwar bei CD4 und bei GATA3 Tumorassoziation und -infiltration nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 35 und 39), aber ohne signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten. Das Ergebnis war allerdings limitiert durch die hohe Anzahl zur Bewertung ungeeigneter Schnitte innerhalb der Kohorten mit geringen Tumoranteilen im LK (Kohorten I-III).

### 4.3 Kostimulatorische Moleküle antigen-präsentierender Zellen

Bei CD40 und CD80 handelt es sich um kostimulatorische Moleküle, die auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Besonders bei dendritischen Zellen fungieren CD40 und CD80 als ein kostimulierendes Signal für die Zellaktivierung, wobei beide Rezeptoren während der Reifung hochreguliert werden und so eine antitumorale Immunantwort verstärken können. Die Liganden beider Rezeptoren werden von T-Zellen exprimiert und lauten CD40L für CD40, sowie CD28 und CTLA-4 für CD80 (Kooten und Banchereau 1997). Ein Vergleich zwischen SLKs und NSLKs bei den gleichen Patienten zeigte eine signifikant verminderte Expression von CD40 und CD80 im SLK (Essner und Kojima 2002). Im Widerspruch dazu ergab sich bei Mansfield et al. eine erhöhte Expression von CD40 bei einem Vergleich zwischen positiven und negativen SLKs mit gesunden LKs (Mansfield et al. 2011). Eine weitere Studie stützt die Vermutung, dass das Fehlen von CD80 zu einer verminderten Immunüberwachung führt und so die Prognose beeinträchtigt (Denfeld et al. 1995). Die Einteilung positiver SLKs in vier unterschiedliche Kohorten führte zu keinen signifikanten Unterschieden (siehe Abbildungen 44 und 48). Bei CD40 konnte eine deutliche Tumorassoziation in den Kohorten II-IV festgestellt werden, wobei in Kohorte IV der mittlere Score mit 1,57 am höchsten war. Die Tumorinfiltration CD40-positiver Zellen und die TA und TI CD80-positiver Zellen fielen in allen Kohorten schwach aus (Score < 1). Die Unterschiede zwischen den Kohorten waren nicht signifikant. Eine Expression von CD40 und CD80 durch das Melanom, wie sie bereits von anderen Autoren nachgewiesen wurde (Hersey et al. 1994; Thomas et al. 1996), konnte immunhistochemisch nicht festgestellt werden.

Die immunhistologische Untersuchung konnte auch nicht zeigen, dass kostimulatorische Moleküle einen signifikanten Einfluss auf die Prognose oder die Tumorlast bei Patienten mit metastasierten Melanomen haben. Es konnten auch keine anderen prognostischen Rückschlüsse nur anhand des Ausmaßes von assoziierenden und infiltrierenden CD40- und CD80-positiven Zellen abgeleitet werden. Dennoch belegt die klinische Etablierung des CTLA-4-Blockers Ipilimumab im Rahmen der Immuntherapie zur Behandlung von metastasierten Melanomen den Einfluss von CD80 auf die tumorspezifische Immunabwehr (Pardoll 2012). Bisweilen wurde auch beschrieben, dass eine erhöhte Expression von CD40 mit einer erhöhten Expression von CD80 verbunden ist (Nakajima et al. 1998). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mit einer Rangkorrelation nach Spearman bestätigt werden (siehe Tabelle 46 und 49). Außerdem ergab sich eine positive Rangkorrelation mit B-Zellen (CD40 und CD80) und Makrophagen (CD40), mit dendritischen Zellen konnte entgegen der Erwartung keine Korrelation nachgewiesen werden.

#### 4.4 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein sehr kleines und bioaktives Molekül, das von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase; NOS) gebildet wird. Es gibt verschiedene Isoformen der NOS, von großer immunologischer Bedeutung ist vor allem die sogenannte induzierbare NO-Synthase (iNOS), die von T-Zellen, Makrophagen und reifen dendritischen Zellen exprimiert werden kann. Die Induktion von iNOS erfolgt vorwiegend durch Zytokine und es reguliert durch die Bildung von NO und die damit verbundene Nitrierung die Differenzierung und Funktion von Immunzellen. iNOS zeigt multiple Wirkweisen in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Krankheit (Bogdan et al. 2000). Es wurde zwar darüber berichtet, dass eine hohe Konzentration von NO zytotoxisch auf Tumorzellen wirkt, aber die kontinuierliche und intrazelluläre Produktion geringer Mengen von NO intrazellulär wirkt sich auch progressiv auf das Tumorwachstum aus, indem dadurch anti-apoptotische Effekte bei Melanomzellen induziert werden, was dann die Prognose beeinträchtigen kann (Salvucci et al. 2001; Tang und Grimm 2004). Darüber hinaus wird iNOS auch von Melanomen exprimiert, wobei die Expression mit der Tumorprogression korreliert, weshalb es ein unabhängiger prognostischer Marker für das Überleben von Patienten mit metastasiertem Melanom ist (Massi et al. 2001; Johansson et al. 2009). Durch die Einteilung von Patienten mit positiven SLKs in die vier vordefinierten Kohorten und die anschließende mikroskopische Untersuchung der iNOS-Expression konnte nachgewiesen werden, dass in allen Kohorten iNOS exprimiert wurde. Dabei fiel auf, dass nur bei 64 % der LKs in Kohorte I iNOS exprimiert wurde, während der immunhistochemische Nachweis in Kohorte III bei 90 % der LKs positiv ausfiel. Ebenso war die Konzentration von iNOS-positiven Immunzellen in Kohorte III gegenüber Kohorte I signifikant erhöht (siehe Abbildung 52). Diese beiden Kohorten unterschieden sich auch eklatant in der Prognose.

Wie es bei anderen Autoren bereits beschrieben wurde, scheint sich eine vermehrte Expression von iNOS also negativ auf die Prognose auszuwirken (Ekmekcioglu et al. 2003; Johansson et al. 2009; Ekmekcioglu et al. 2016). Während die genannten Autoren vor allem die iNOS-Expression des Tumorgewebes in den Fokus genommen haben, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich der Konzentration iNOS-exprimierender Immunzellen im LK ohne eine Einbeziehung von Tumorgewebe als solches durchgeführt. Dennoch ist das Ergebnis interessant, weil es die Vermutung nahelegt, dass die Melanomzellen bei aggressivem Krankheitsverlauf eine erhöhte Expression von iNOS in T-Zellen, Makrophagen und reifen dendritischen Zellen induzieren, was sich im LK wiederum immunsupprimierend auswirkt und wodurch die Tumorprogression Metastasierungspotenzial weiter erhöht werden. In Fällen mit hoher Tumorlast zeigte sich mitunter eine deutliche Expression von iNOS durch das Melanom. Es infiltrierten aber auch einzelne iNOS-exprimierende Immunzellen das Tumorgewebe (siehe Abbildung 51). Insgesamt waren allerdings die Assoziation und die Infiltration iNOS-positiver Zellen mit einem Score von < 1 sehr gering. Die Kohorte II zeigte weder Infiltration noch Assoziation. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man also nicht von einer prognostischen Wertigkeit der TA und TI iNOS-positiver Zellen ausgehen.

## 4.5 Indolamin-2,3-Dioxygenase

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein Enzym, das L-Tryptophan in N-Formylkynurenin umwandelt und in sehr vielen Geweben gebildet wird. Funktionell wirksam ist es bei der Bildung einer mütterlichen Immuntoleranz gegenüber dem Fötus (Munn et al. 1998) und bei der Bildung einer Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (Grohmann et al. 2003), wobei es immunologisch supprimierend wirkt. Exprimierende Immunzellen können Makrophagen und dendritische Zellen sein, wobei durch die Expression von IDO die antigen-präsentierenden Eigenschaften eingeschränkt werden (Munn et al. 1999; Hwu et al. 2000). Einige Autoren konnten bereits nachweisen, dass IDO auch von Melanomzellen exprimiert wird. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass der Tumor die immunologischen Eigenschaften von IDO nutzt, um eine Immuntoleranz aufzubauen und so einer antitumoralen Immunantwort zu entkommen (Prendergast et al. 2009). Die Expression von IDO korrelierte dabei im SLK mit der Anzahl FoxP3-exprimierender regulatorischer T-Zellen und daher auch mit einer schlechteren Prognose (Lee et al. 2003; Brody et al. 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Expression von IDO durch Melanomzellen in einigen Schnitten (siehe Abbildung 55), wobei allerdings kein Zusammenhang mit der Prognose hergestellt werden konnte. Der Vergleich zwischen positiven und negativen SLKs führte zu einer erhöhten IDO Expression bei Patienten mit positiven SLKs (Ryan et al. 2014). Die immunhistochemische Untersuchung von IDO in positiven SLKs im Rahmen der vorliegenden Arbeit lieferte den höchsten Anteil IDOpositiver Immunzellen in den Kohorten I und IV und den geringsten in der Kohorte III (siehe Abbildung 56).

Bei den ausgewerteten Zellen handelte es sich um Makrophagen und dendritische Zellen, Melanomzellen gingen nicht in die Bewertung ein, da das Tumorgewebe in vielen Paraffinschnitten nicht mehr angeschnitten oder abgeschwemmt war. Entgegen der Erwartung, dass IDO als immunsupprimierendes Effektormolekül wirkt, kam es gegenüber den anderen drei Kohorten mit guter Prognose signifikant vermindert in der Kohorte III mit schlechter Prognose vor. Dieses scheinbare Paradoxon könnte man möglicherweise auf die allgemein geringe Anzahl antigen-präsentierender Zellen in dieser Kohorte zurückführen, weil dadurch auch die Anzahl IDO-exprimierender antigen-präsentierender Zellen vermindert wäre. Unterstützt wird diese These durch die positive Rangkorrelation nach Spearman zwischen IDO und CD68-positiven Makrophagen. Ebenfalls bemerkenswert ist die hohe IDO-Konzentration in der Kohorte I. Ein möglicher Grund könnte eine durch Melanomzellen induzierte erhöhte Expression von IDO auf antigen-präsentierenden Zellen oder eine Rekrutierung aus dem umliegenden Gewebe in der frühen Phase der Tumorentstehung als Vorbereitung auf die Metastasierung sein. Eine andere Autorengruppe konnte zeigen, dass die IDO-Expression im SLK mit der Tumorlast korreliert (Lee et al. 2011). Es ergab sich zwar auch in der vorliegenden Arbeit eine hohe Expression in der Kohorte I, der Vergleich zwischen den Kohorten II und III mit kleiner Tumorlast und Kohorte IV mit großer Tumorlast führte aber zu einer signifikant erhöhten Expression in Kohorte IV. Dadurch wird die Annahme bestätigt, dass eine erhöhte Tumorlast mit einer erhöhten Expression von IDO verbunden ist. Bei der Auswertung wurde auch die anatomische Lage der entnommenen LKs nicht berücksichtigt. Von einer Autorengruppe wurde allerdings berichtet, dass IDO im Tierversuch in jugulären LKs signifikant häufiger exprimiert wird als in axillären LK (Dai und Zhu 2010). Dies sollte daher in nachfolgenden Untersuchungen zu diesem Thema in die Auswertung einbezogen werden. Es konnten zwar in den Kohorten II-IV eine geringe Assoziation und Infiltration von IDO-exprimierenden Zellen in das Tumorgewebe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 54), dabei konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten festgestellt werden. Deshalb kann auch für TA und TI IDO-positiver Zellen keine valide Aussage über die prognostische Wertigkeit getroffen werden.

# 4.6 Beurteilung der wissenschaftlichen Methodik

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben (FFPE) durchgeführt, die sich sehr gut für immunhistochemische Untersuchungen eignen, da durch das schnelle Einbetten die Unversehrtheit der Antigene bewahrt wird. Außerdem bleibt die Morphologie des Gewebes besser erhalten als bspw. bei Gefrierschnitten. FFPE lassen sich gut lagern und lang aufbewahren. Nachteile sind die kanzerogene Wirkung von Formalin und das cross-linking von Antigenen, also eine Blockade der Antigene durch chemische Reaktionen. Es kann allerdings durch Hitze, chemisch oder enzymatisch im Sinne eines antigen retrieval rückgängig gemacht werden.

Die Auswahl der Kohorten diente der Charakterisierung positiver SLKs im Hinblick auf immunologische Prozesse zur Bekämpfung des Tumors. Für zukünftige Untersuchungen wäre ein Vergleich mit negativen SLKs oder gesunden LK sinnvoll, um die immunologischen Veränderungen der quantitativ bestimmten Zellanzahl zwischen krankem und gesundem LK bestimmen und mit der vorhandenen Literatur vergleichen zu können. Für weitere Erkenntnisse könnte man auch eine fünfte Kohorte mit einer hohen Tumorlast und einer schlechten Prognose etablieren um sie mit den bereits definierten und analysierten Kohorten zu vergleichen. So könnte man möglicherweise prognostisch wichtige immunologische Unterschiede erkennen und weitere Einblicke hinsichtlich des Verständnisses der immunologischen Tumorbekämpfung erhalten.

Wegen der hohen Anzahl der verschiedenen getesteten Antikörper konnten abgeschwemmte oder zerstörte Schnitte nicht wiederholt und auch bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden, sodass die Fallzahlen bei den einzelnen Immunfärbungen leicht variieren. Die Paraffinblöcke waren jedoch in diesen Fällen bereits so ausgedünnt, dass keine weiteren Schnitte gewonnen werden konnten.

Die quantitative Auswertung der Zellanzahl mit Hilfe des Programms ImageJ wurde ausgewählt, um ein genaues quantitatives Messverfahren zu erreichen, ohne die Zellen in den einzelnen Schnitten manuell zu zählen. Die Methode ist reproduzierbar und die Ergebnisse variieren nur marginal beim Vergleich zwischen unterschiedlichen Untersuchern. Dennoch gibt es leichte vom Untersucher abhängige Differenzen bei der optimalen Einstellung der Parameter. Für eine noch höhere Sensitivität und die Erfassung ganzer Lymphknoten wäre es für die Zukunft hilfreich, ein Programm oder einen Algorithmus auf einer Grundlage der in diesem Programm verwendeten Parameter zu schreiben, um die Auswertung zu erleichtern und zu automatisieren.

Die Auswahl der Immunfärbungen für diese Arbeit war bereits sehr umfangreich, aber eine Erweiterung des Panels für nachfolgende Untersuchungen ist dennoch zu empfehlen. So sollte neben dem spezifischen Marker für TH2-polarisierte T-Helferzellen GATA3 auch der spezifische Marker für TH1-polarisierte T-Helferzellen T-bet in spätere Untersuchungen einbezogen werden. Ebenso interessant ist neben IDO die Expression von FoxP3, der spezifisch für regulatorische T-Zellen ist. Außerdem gibt es bei Zellen wie T-Helferzellen (CD4) und DZ (CD1a) teilweise Subtypen, die zwar die gleichen immunhistochemisch wichtigen Antigene tragen, sich aber in ihrer immunologischen Funktion stark voneinander unterscheiden (Bernstein et al. 2006; van de Ven et al. 2011; Kim und Cantor 2014). Bei einer genaueren Untersuchung sollten Unterschiede innerhalb der Kohorten im Hinblick auf den genauen Phänotyp dieser Subtypen und deren Verteilung analysiert werden.

Die Auswertung von Tumorassoziation und -infiltration war in den Kohorten mit kleiner Tumormasse zum einen eingeschränkt, da die Anteile des Lymphknotens mit tumorhaltigem Gewebe nicht mehr angeschnitten waren. Zum anderen war jedoch das Tumorgewebe oft so klein, dass man es ohne tumorspezifische Anfärbung nicht klar erkennen konnte.

Für zukünftige Analysen von Lymphknoten, auch mit kleiner Tumormasse, würde sich ein Verfahren eignen, das die Färbung von Tumorgewebe und spezifischen Immunzellen ermöglicht. Es existieren bereits Verfahren, die es ermöglichen, einen Paraffinschnitt nach der Färbung zu digitalisieren, die Färbung dann zu entfernen und anschließend denselben Schnitt mit einer zweiten Färbung zu versehen. Durch dieses Verfahren ist es möglich, zwei oder mehr Immunfärbungen digital übereinander zu legen. Mit diesem Verfahren könnte man die Melanomzellen auch bei geringer Tumormasse eindeutig identifizieren und assoziierende oder infiltrierende Zellen besser erkennen.

Die quantitative Analyse anhand mehrerer *hotspots* ist in der Pathologie ein gängiges Verfahren. Genauer und für weitere Studien auf diesem Gebiet interessant ist eine vollständige Analyse eines Lymphknotenpräparates. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die *hotspots* unabhängig von der Mikroanatomie des Lymphknotens ausgewählt. Die Auswertung eines kompletten Schnittes könnte allerdings möglicherweise loko-regionale Unterschiede der Immunzellverteilung innerhalb des Lymphknotens in den einzelnen Kohorten zeigen. So konnten bereits verschiedene Autoren Unterschiede bei der Expression unterschiedlicher Immunzellmarker in Abhängigkeit von der Makro- oder Mikroanatomie des Lymphknotens nachweisen (Cochran et al. 1987; Messaoudene et al. 2015).

5 Zusammenfassung 88

# 5 Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung bestand darin, SLK von Patienten mit metastasiertem Melanom, die sich in der Tumorlast und im klinischem Verlauf voneinander unterscheiden, im Hinblick auf immunologische Unterschiede zu untersuchen und zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden archivierte Paraffinblöcke aufbereitet und anhand eines umfangreichen Antikörper-Panels zu unterschiedlichen Zellpopulationen immunhistochemisch angefärbt. In den SLK wurde untersucht, ob die angefärbten Immunzellen mit dem Tumorgewebe interagieren, was als eine immunologische Reaktion auf den Tumor gewertet wurde. Hier wurden dann die Tumorassoziation und Tumorinfiltration anhand semiquantitativer Scores ausgewertet. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung des immunologischen Mikromilieus in den Lymphknoten anhand einer quantitativen Methode. Im Anschluss daran erfolgten die Entblindung und der Vergleich der Kohorten. Diese gliederten sich in Kohorte I mit "in-situ-Metastasen" und sehr guter Prognose, Kohorte II mit geringer Tumorlast und guter Prognose, Kohorte IV mit hoher Tumorlast und guter Prognose.

Tumorassoziation und Tumorinfiltration waren bei den meisten untersuchten Zellpopulationen teilweise nur sehr schwach ausgeprägt (CD56, CD80), teilweise aber auch deutlich (CD8, CD20). Eine signifikant stärkere Tumorassoziation zeigte sich bei den Plasmazellen (CD138) in Kohorte IV gegenüber den Kohorten II und III sowie bei seneszenten zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen (CD57) in Kohorte II und IV gegenüber Kohorte III. Die Tumorinfiltration von B-Zellen (CD20) und Plasmazellen (CD138) in Kohorte IV war signifikant erhöht gegenüber Kohorte III. Eine prognostische Wertigkeit von assoziierenden und infiltrierenden B-Zellen, Plasmazellen und seneszenten zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen ist demnach denkbar. Die Ergebnisse zeigen zwar wegen der geringen Fallzahl eine Streubreite, sie geben aber einen Trend an, der in nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden sollte.

Die Konzentration immunologischer Zellpopulationen variierte teilweise deutlich in den Lymphknoten der Kohorten. Sehr interessant war eine signifikant erhöhte Anzahl von T-Helferzellen (CD4) und TH-2-Zellen (GATA3) in Kohorte I gegenüber Kohorte II, was für eine erhöhte Immunabwehr in der frühen Phase der lymphogenen Metastasierung sprechen könnte. Eine Erhöhung der immunregulatorischen TH-2-Zellen scheint auf den ersten Blick paradox, hier sollte allerdings in folgenden Untersuchungen das Verhältnis zu den TH-1-Zellen bestimmt und ein Vergleich gezogen werden. Weiterhin zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von Makrophagen (CD68) in Kohorte I gegenüber Kohorte III. Hier scheint eine prognostische Wertigkeit zu bestehen. Ebenfalls interessant war eine signifikante Erhöhung IDO-positiver antigen-präsentierender Zellen in den Kohorten I und IV gegenüber Kohorte III.

Die IDO-Expression des Tumorgewebes ist nach der aktuellen Literatur ein verlässlicher Faktor für eine ungünstigere Prognose, aber die Expression von IDO in immunologischen 5 Zusammenfassung 89

Zellpopulationen scheint eine konträre prognostische Wertigkeit aufzuweisen, wobei möglicherweise die antitumoralen Eigenschaften der exprimierenden Zellen überwiegen. iNOS zeigte sich signifikant erhöht in Kohorte III gegenüber Kohorte I, was die Annahme einer beeinträchtigten Prognose bei einer erhöhten iNOS-Expression unterstreicht. Ebenfalls interessant war die signifikant erhöhte Konzentration von NK-Zellen (CD56) in Kohorte III gegenüber den Kohorten I, II und IV. Diese Ergebnisse sind allerdings volatil wegen der geringen Expression von CD56. Die prognostische Bedeutung von CD57, die sich bereits bei der Tumorassoziation gezeigt hat, bestätigte sich auch im Mikromilieu des Lymphknotens. Hier wiesen die Kohorten II und IV eine signifikante Erhöhung gegenüber Kohorte III auf.

Schließlich konnte auch die Expression von CD1a, iNOS und IDO durch den Tumor nachgewiesen werden. Die Tumorexpression von iNOS und IDO wurde bereits hinreichend belegt. Die Tumorexpression von CD1a, die möglicherweise ein Mechanismus des Tumors ist, der Immunüberwachung zu entkommen, wurde bisher in der Literatur allerdings nicht beschrieben. Die Anzahl der exprimierenden SLK war allerdings zu gering, um prognostische Aussagen daraus ableiten zu können.

### 6 Literaturverzeichnis

Abo T, Balch CM (1981): A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). J Immunol <u>127</u>, 1024–1029.

Acker VHH, Capsomidis A, Smits EL, Tendeloo VFV (2017): CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? Front Immunol <u>8</u>, 892.

Ali TH, Pisanti S, Ciaglia E, Mortarini R, Anichini A, Garofalo C, Tallerico R, Santinami M, Gulletta E, Ietto C, et al. (2014): Enrichment of CD56 dim KIR+CD57+ highly cytotoxic NK cells in tumour-infiltrated lymph nodes of melanoma patients. Nat Commun <u>5</u>, 5639.

Ali Z, Yousaf N, Larkin J (2013): Melanoma epidemiology, biology and prognosis. EJC Suppl 11, 81-91.

Ardekani GS, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G (2012): The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. PLoS One 7, e47054.

Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA (1980): The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. Cancer 45, 3012–3017.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, et al. (2009): Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol <u>27</u>, 6199–6206.

Banchereau J, Dubois B, Fayette J, Burdin N, Brière F, Miossec P, Rissoan MC, van Kooten C, Caux C (1995): Functional CD40 antigen on b cells, dendritic cells and fibroblasts. Adv Exp Med Biol <u>378</u>, 79–83.

Barbour AH, Coventry BJ (2003): Dendritic cell density and activation status of tumour-infiltrating lymphocytes in metastatic human melanoma: possible implications for sentinel node metastases. Melanoma Res <u>13</u>, 263–269.

Barois N, Saint-Vis BD, Lebecque S, Geuze HJ, Kleijmeer MJ (2002): MHC Class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. Traffic 3, 894–905.

Barth A, Wanek LA, Morton DL (1995): Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. J Am Coll Surg <u>181</u>, 193–201.

Bentham G, Aase A (1996): Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. Int J Epidemiol <u>25</u>, 1132–1138.

Bernstein HB, Plasterer MC, Schiff SE, Kitchen CMR, Kitchen S, Zack JA (2006): CD4 expression on activated NK cells: Ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration. J Immunol <u>177</u>, 3669–3676.

Betjes MGH, Haks MC, Tuk CW, Beelen RHJ (1991): Monoclonal antibody EBM11 (anti-CD68) discriminates between dendritic cells and macrophages after short-term culture. Immunobiology 183, 79–87.

Biswas P, Mantelli B, Sica A, Malnati M, Panzeri C, Saccani A, Hasson H, Vecchi A, Saniabadi A, Lusso P, et al. (2003): Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. Blood 101, 4452–4456.

Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, et al. (2010): Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood <u>116</u>, 3853–3864.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A (2000): The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev <u>173</u>, 17–26.

Bosisio FM, Wilmott JS, Volders N, Mercier M, Wouters J, Stas M, Blokx WA, Massi D, Thompson JF, Scolyer RA, et al. (2016): Plasma cells in primary melanoma. Prognostic significance and possible role of IgA. Mod Pathol <u>29</u>, 347–358.

Botella-Estrada R, Dasí F, Ramos D, Nagore E, Herrero M, Giménez J, Fuster C, Sanmartín O, Guillén C, Aliño S (2005): Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. Melanoma Res <u>15</u>, 99–106.

Bray F, Soerjomataram I, Siegel R, Ferlay J, Torre L, Jemal A. https://gco.iarc.fr/today/home Zugriff am 14.04.2020.

Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, et al. (2003): Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. Blood <u>101</u>, 2711–2720.

Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, Emmons RV, Witkiewicz AK (2009): Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. Cell Cycle <u>8</u>, 1930–1934.

Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stromberg AJ, Hagendoorn L, Martin CGR, McMasters KM (2011): Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. Am J Surg 202, 659–664.

Carey DJ (1997): Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. Biochem J 327, 1-16.

Cascinelli N, Belli F, Santinami M, Fait V, Testori A, Ruka W, Cavaliere R, Mozzillo N, Rossi CR, MacKie RM, et al. (2000): Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: The WHO melanoma program experience. Ann Surg Oncol 7, 469–474.

Cascinelli N, Bombardieri E, Bufalino R, Camerini T, Carbone A, Clemente C, Lenisa L, Mascheroni L, Maurichi A, Pennacchioli E, et al. (2006): Sentinel and nonsentinel node status in stage IB and II melanoma patients: Two-step prognostic indicators of survival. J Clin Oncol <u>24</u>, 4464–4471.

Chen X, Oppenheim JJ (2011): Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. Int Immunopharmacol <u>11</u>, 1489–1496.

Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, Neyns B, Krysko O, Bachert C, Hennart B, Allorge D, van Geel N, Gele MV, Brochez L (2015): Characterization of the in vivo immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma. Oncoimmunology 4, e982382.

Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N (1996): Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer <u>77</u>, 1303–1310.

Cochran AJ, Pihl E, Wen DR, Hoon DSB, Korn EL (1987): Zoned immune suppression of lymph nodes draining malignant melanoma: histologic and immunohistologic studies. JNCI J Natl Cancer Inst 78, 399–405.

Cochran AJ, Morton DL, Stern S, Lana AMA, Essner R, Wen DR (2001): Sentinel lymph nodes show profound downregulation of antigen-presenting cells of the paracortex: Implications for tumor biology and treatment. Mod Pathol <u>14</u>, 604–608.

Cochran AJ, Wen DR, Huang RR, Wang HJ, Elashoff R, Morton DL (2004): Prediction of metastatic melanoma in nonsentinel nodes and clinical outcome based on the primary melanoma and the sentinel node. Mod Pathol <u>17</u>, 747–755.

Coens C, Suciu S, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, et al. (2017): Phase III trial (EORTC 18071 / CA184-029) of post-operative adjuvant ipilimumab compared to placebo in patients with resected stage III cutaneous melanoma: Health Related Quality of Life (HRQoL) results. Lancet Oncol <u>18</u>, 393-403.

Coventry B, Heinzel S (2004): CD1a in human cancers: a new role for an old molecule. Trends Immunol <u>25</u>, 242–248.

Dai X, Zhu BT (2010): Indoleamine 2,3-Dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: Implications for its biological functions. J Histochem Cytochem <u>58</u>, 17–28.

Danese S, Sans M, Fiocchi C (2004): The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. Gut <u>53</u>, 1035–1043.

Denfeld RW, Dietrich A, Wuttig C, Tanczos E, Weiss JM, Vanscheidt W, Schöpf E, Simon JC (1995): In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: Relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity. Int J Cancer <u>62</u>, 259–265.

Dewar D, Newell B, Green M, Topping A, Powell B, Cook M. (2004): The microanatomic location of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. J Clin Oncol <u>22</u>, 3345–3349.

Ekmekcioglu S, Ellerhorst JA, Mumm JB, Zheng M, Broemeling L, Prieto VG, Stewart AL, Mhashilkar AM, Chada S, Grimm EA (2003): Negative association of melanoma differentiation-associated gene (mda-7) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human melanoma: MDA-7 regulates iNOS expression in melanoma cells. Mol Cancer Ther <u>2</u>, 9–17.

Ekmekcioglu S, Davies MA, Tanese K, Roszik J, Shin-Sim M, Bassett RL, Milton DR, Woodman SE, Prieto VG, Gershenwald JE, et al. (2016): Inflammatory marker testing identifies CD74 expression in melanoma tumor cells, and its expression associates with favorable survival for stage III melanoma. Clin Cancer Res <u>22</u>, 3016–3024.

Elenius K, Salmivirta M, Inki P, Mali M, Jalkanen M (1990): Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins. J Biol Chem <u>265</u>, 17837–17843.

Ellmeier W, Haust L, Tschismarov R (2013): Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. Cell Mol Life Sci <u>70</u>, 4537-4553.

Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL (2012): Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. Cancer Res <u>72</u>, 1070–1080.

Essner R, Kojima M (2002): Dendritic cell function in sentinel nodes. Oncology (Williston Park) 16, 27-31.

Essner R, Kojima M (2001): Surgical and molecular approaches to the sentinel lymph nodes. Ann Surg Oncol <u>8</u>, 31-34.

Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ (1993): In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. J Exp Med <u>178</u>, 1567–1575.

Francischetto T, Spector N, Rezende JFN, Antunes MA, Romano SO, Small IA, Ferreira CG (2010): Influence of sentinel lymph node tumor burden on survival in melanoma. Ann Surg Oncol <u>17</u>, 1152–1158.

Franzke A, Probst-Kepper M, Buer J, Duensing S, Hoffmann R, Wittke F, Volkenandt M, Ganser A, Atzpodien J (1998): Elevated pretreatment serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and lactate dehydrogenase as predictors of survival in cutaneous metastatic malignant melanoma. Br J Cancer 78, 40–45.

Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM (1989): B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. J Immunol 143, 2714–2722.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF (2005): Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. Eur J Cancer <u>41</u>, 2040–2059.

Garbe C, Krüger S, Orfanos CE, Büttner P, Weiß J, Soyer HP, Stocker U, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, et al. (1994): Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: Multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. J Invest Dermatol 102, 695–699.

Garbe C, Büttner P, Ellwanger U, Bröcker EB, Jung EG, Orfanos CE, Rassner G, Wolff HH (1995): Das Zentralregister Malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft in den Jahren 1983–1993 Epidemiologische Entwicklungen und aktuelle therapeutische Versorgung des malignen Melanoms der Haut. Hautarzt 46, 683–692.

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann R, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, et al. (2007): Evidence and interdisciplinary consense-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. Melanoma Res <u>17</u>, 393–399.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos AJ, et al. (2016): Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. Eur J Cancer <u>63</u>, 201–217.

Gay D, Maddon P, Sekaly R, Talle MA, Godfrey M, Long E, Goldstein G, Chess L, Axel R, Kappler J, Marrack P (1987): Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. Nature 328, 626–629.

Germain RN (2002): T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. Nat Rev Immunol 2, 309–322.

Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI (1999): Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. J Clin Oncol <u>17</u>, 976–983.

Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, et al. (2017): Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. CA Cancer J Clin <u>67</u>, 472–492.

Gharbaran R (2015): Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies. Crit Rev Oncol Hematol <u>94</u>, 1–17.

Gibbings DJ, Marcet-Palacios M, Sekar Y, Ng MC, Befus AD (2007): CD8 $\alpha$  is expressed by human monocytes and enhances Fc $\gamma$ R-dependent responses. BMC Immunol <u>8</u>, 12.

Golay JT, Clark EA, Beverley PC (1985): The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. J Immunol 135, 3795–3801.

Greaves DR, Gordon S (2002): Macrophage-specific gene expression: Current paradigms and future challenges. Int J Hematol <u>76</u>, 6–15.

Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Orabona C, Vacca C, Fioretti MC, Puccetti P (2003): A defect in Tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. J Exp Med 198, 153-160.

Grotz TE, Jakub JW, Mansfield AS, Goldenstein R, Enninga EAL, Nevala WK, Leontovich AA, Markovic SN (2015): Evidence of Th2 polarization of the sentinel lymph node (SLN) in melanoma. Oncoimmunology 4, e1026504.

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Kaempgen E, et al. (2012): Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet <u>380</u>, 358–365.

Hengge UR, Ruzicka T (Hrsg.): Lehrbuch der Dermatologie und Venerologie: ihr roter Faden durchs Studium nach der neuen ÄAppO. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart 2006.

Hersey P, Si Z, Smith MJ, Thomas WD (1994): Expression of the co-stimulatory molecule B7 on melanoma cells. Int J Cancer <u>58</u>, 527–532.

Ho IC, Tai TS, Pai SY (2009): GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. Nat Rev Immunol <u>9</u>, 125–135.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al. (2010): Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med <u>363</u>, 711-723.

Holness CL, Simmons DL (1993): Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. Blood 81, 1607–1613.

Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA (2000): Indoleamine 2,3-Dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol <u>164</u>, 3596–3599.

Ives NJ, Suciu S, Eggermont AMM, Kirkwood J, Lorigan P, Markovic SN, Garbe C, Wheatley K, Bufalino R, Cameron D, et al. (2017): Adjuvant interferon-α for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. Eur J Cancer <u>82</u>, 171–183.

Jaronen M, Quintana FJ (2014): Immunological relevance of the coevolution of IDO1 and AHR. Front Immunol <u>5</u>, 521.

Johansson CC, Egyházi S, Masucci G, Harlin H, Mougiakakos D, Poschke I, Nilsson B, Garberg L, Tuominen R, Linden D, et al. (2009): Prognostic significance of tumor iNOS and COX-2 in stage III malignant cutaneous melanoma. Cancer Immunol Immunother <u>58</u>, 1085–1094.

Johnson TS, Munn DH (2012): Host Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Contribution to systemic acquired tumor tolerance. Immunol Invest <u>41</u>, 765–797.

Kaczmarek R, Pasciak M, Szymczak-Kulus K, Czerwinski M (2017): CD1: A singed cat of the three antigen presentation systems. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) <u>65</u>, 201–214.

Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, Burke H, Yearley JH, Thompson JF, Hersey P, Long GV, Scolyer RA (2015): Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. Mod Pathol <u>28</u>, 1535–1544.

Kalialis L, Drzewiecki K, Klyver H (2009): Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. Melanoma Res <u>19</u>, 275–282.

Kanzaki M, Shibata H, Mogami H, Kojima I (1995): Expression of calcium-permeable cation channel CD20 accelerates progression through the G1 phase in Balb/c 3T3 cells. J Biol Chem <u>270</u>, 13099–13104.

Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SLF, Larbi A (2016): CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. Cancer Immunol Immunother <u>65</u>, 441–452.

Kazazi F, Mathijs J-M, Foley P, Cunningham AL (1989): Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationship to infection with the human immunodeficiency virus. J Gen Virol <u>70</u>, 2661–2672.

Kelly-Rogers J, Madrigal-Estebas L, O'Connor T, Doherty DG (2006): Activation-induced expression of CD56 by T cells is associated with a reprogramming of cytolytic activity and cytokine secretion profile in vitro. Hum Immunol <u>67</u>, 863–873.

Kim HJ, Cantor H (2014): CD4 T-cell subsets and tumor immunity: The helpful and the not-so-helpful. Cancer Immunol Res <u>2</u>, 91–98.

Komi DEA, Redegeld FA (2019): Role of mast cells in shaping the tumor microenvironment. Clin Rev Allergy Immunol <u>58</u>, 313-325.

Ladányi A (2015): Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res <u>28</u>, 490–500.

Ladoire S, Senovilla L, Enot D, Ghiringhelli F, Poirier-Colame V, Chaba K, Erdag G, Schaefer JT, Deacon DH, Zitvogel L, et al. (2016): Biomarkers of immunogenic stress in metastases from melanoma patients: Correlations with the immune infiltrate. Oncoimmunology <u>5</u>, e1160193.

Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH (1989): Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. J Exp Med <u>169</u>, 2233–2238.

Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH (1991): Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). J Immunol <u>146</u>, 4421–4426.

Lee JH, Chen Y, Chan JL, Qian Y, Goydos JS (2011): Molecular analysis of melanoma-induced sentinel lymph node immune dysfunction. Cancer Immunol Immunother <u>60</u>, 685–692.

Lee JR, Dalton RR, Messina JL, Sharma MD, Smith DM, Burgess RE, Mazzella F, Antonia SJ, Mellor AL, Munn DH (2003): Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. Lab Invest <u>83</u>, 1457–1466.

León P, Daly JM, Synnestvedt M, Schultz DJ, Elder DE, Clark WH (1991): The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. Arch Surg 126, 1461–1468.

Lipsker D, Engel F, Cribier B, Velten M, Hedelin G (2007): Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma. Br J Dermatol <u>157</u>, 338–343.

Lucey DR, Dorsky DI, Nicholson-Weller A, Weller PF (1989): Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120. J Exp Med 169, 327–332.

Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Axel R (1985): The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: A new member of the immunoglobulin gene family. Cell <u>42</u>, 93-104.

Mahnke YD, Devevre E, Baumgaertner P, Matter M, Rufer N, Romero P, Speiser DE (2012): Human melanoma-specific CD8+ T-cells from metastases are capable of antigen-specific degranulation and cytolysis directly ex vivo. Oncoimmunology <u>1</u>, 467-530.

Mansfield AS, Holtan SG, Grotz TE, Allred JB, Jakub JW, Erickson LA, Markovic SN (2011): Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis. Mod Pathol <u>24</u>, 487–494.

Marshall MJE, Stopforth RJ, Cragg MS (2017): Therapeutic antibodies: What have we learnt from targeting CD20 and where are we going? Front Immunol 8, 1245.

Massi D, Franchi A, Sardi I, Magnelli L, Paglierani M, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M (2001): Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. J Pathol <u>194</u>, 194–200.

Messaoudene M, Fregni G, Fourmentraux-Neves E, Chanal J, Maubec E, Mazouz-Dorval S, Couturaud B, Girod A, Sastre-Garau X, Albert S, et al. (2014): Mature cytotoxic CD56bright/CD16+ natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. Cancer Res 74, 81–92.

Messaoudene M, Périer A, Fregni G, Neves E, Zitvogel L, Cremer I, Chanal J, Sastre-Garau X, Deschamps L, Marinho E, et al. (2015): Characterization of the microenvironment in positive and negative sentinel lymph nodes from melanoma patients. PLoS One <u>10</u>, e0133363.

Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D (2010): Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst <u>102</u>, 493–501.

Moebius U, Kober G, Griscelli AL, Hercend T, Meuer SC (1991): Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. Eur J Immunol <u>21</u>, 1793-1800.

Mohos A, Sebestyén T, Liszkay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I, Ladányi A (2013): Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma – FOXP3+ cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. J Transl Med 11, 43.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ (1992): Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg 127, 392–399.

Munn DH, Mellor AL (2016): IDO in the tumor microenvironment: Inflammation, counter-regulation, and tolerance. Trends Immunol <u>37</u>, 193–207.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by Tryptophan catabolism. Science <u>281</u>, 1191–1193.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL (1999): Inhibition of T cell proliferation by macrophage Tryptophan catabolism. J Exp Med <u>189</u>, 1363-1372.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, et al. (2002): Potential regulatory function of human dendritic cells expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Science <u>297</u>, 1867–1870.

Nakajima A, Kodama T, Morimoto S, Azuma M, Takeda K, Oshima H, Yoshino S, Yagita H, Okumura K (1998): Antitumor effect of CD40 ligand: Elicitation of local and systemic antitumor responses by IL-12 and B7. J Immunol <u>161</u>, 1901–1907.

Nelemans PJ, Groenendal H, Kiemeney LA, Rampen FH, Ruiter DJ, Verbeek AL (1993): Effect of intermittent exposure to sunlight on melanoma risk among indoor workers and sun-sensitive individuals. Environ Health Perspect 101, 252-255.

Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM (2013): Functional significance of CD57 expression on human NK Cells and relevance to disease. Front Immunol <u>4</u>, 422.

Norment AM, Littman DR (1988): A second subunit of CD8 is expressed in human T cells. EMBO J <u>7</u>, 3433–3439.

O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS (2004): CD138 (Syndecan-1), a plasma cell marker: Immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. Am J Clin Pathol <u>121</u>, 254–263.

O'Rourke AM, Mescher MF (1993): The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function. Immunol Today <u>14</u>, 183-188.

Pardoll DM (2012): The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12, 252-264.

Patel PM, Suciu S, Mortier L, Kruit WH, Robert C, Schadendorf D, Trefzer U, Punt CJA, Dummer R, Davidson N, et al. (2011): Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: Final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). Eur J Cancer 47, 1476–1483.

Patient RK, McGhee JD (2002): The GATA family (vertebrates and invertebrates). Curr Opin Genet Dev <u>12</u>, 416–422.

Patterson S, Gross J, English N, Stackpoole A, Bedford P, Knight SC (1995): CD4 expression on dendritic cells and their infection by human immunodeficiency virus. J Gen Virol <u>76</u>, 1155–1163.

Payne V, Kam PCA (2004): Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. Anaesthesia <u>59</u>, 695–703.

Pehamberger H, Steiner A, Wolff K (1987): In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. J Am Acad Dermatol 17, 571–583.

Penn I (1993): The effect of immunosuppression on pre-existing cancers. Transplantation <u>55</u>, 742–747.

Petrini I, Scatena C, Naccarato AG, Petrini M (2012): CD57 and γδ T-cell receptor expression in nodal metastatic spread of melanoma. Eur J Clin Invest 42, 575–576.

Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P, et al. (2013): Malignant melanoma S3-Guideline "Diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". J Dtsch Dermatol Ges <u>11</u>, 1-116.

Plewig G, Braun-Falco O (Hrsg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie: mit 341 Tabellen. Bd. 2: 6. überarb. u. erw. Aufl., 1. korr. Nachdruck; Springer, Berlin 2015.

Prendergast G, Metz R, Muller AJ (2009): IDO recruits Tregs in melanoma. Cell Cycle <u>8</u>, 1818–1819.

Read RL, Haydu L, Saw RPM, Quinn MJ, Shannon K, Spillane AJ, Stretch JR, Scolyer RA, Thompson JF (2015): In-transit melanoma metastases: Incidence, prognosis, and the role of lymphadenectomy. Ann Surg Oncol <u>22</u>, 475–481.

Rees JL (2003): Genetics of hair and skin color. Annu Rev Genet <u>37</u>, 67–90.

Robert Koch Institut (Hrsg.):

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom\_inhalt. html; Zugriff am 02.12.2019.

Roothans D, Smits E, Lion E, Tel J, Anguille S (2013): CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. Oncoimmunology <u>2</u>, e23037.

Ryan M, Crow J, Kahmke R, Fisher SR, Su Z, Lee WT (2014): FoxP3 and Indoleamine 2,3-Dioxygenase immunoreactivity in sentinel nodes from melanoma patients. Am J Otolaryngol 35, 689–694.

Salvucci O, Carsana M, Bersani I, Tragni G, Anichini A (2001): Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. Cancer Res <u>61</u>, 318–326.

Satzger I, Völker B, Al Ghazal M, Meier A, Kapp A, Gutzmer R (2007): Prognostic significance of histopathological parameters in sentinel nodes of melanoma patients. Histopathology <u>50</u>, 764–772.

Satzger I, Völker B, Meier A, Kapp A, Gutzmer R (2008): Criteria in sentinel lymph nodes of melanoma patients that predict involvement of nonsentinel lymph nodes. Ann Surg Oncol 15, 1723–1732.

Schultz ES, Schuler G (2005): Malignant melanoma. Diagnosis and therapy. HNO <u>53</u>, 928–939.

Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, Urist MM, Ariyan S, Sussman JJ, Edwards MJ, et al. (2006): Gender-related differences in outcome for melanoma patients. Ann Surg <u>243</u>, 693–700.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006): Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. Eur J Cancer 42, 717–727.

Sieling PA (2000): CD1-Restricted T Cells: T Cells with a unique immunological niche. Clin Immunol <u>96</u>, 3–10.

Siiskonen H, Poukka M, Bykachev A, Tyynelä-Korhonen K, Sironen R, Pasonen-Seppänen S, Harvima I (2015): Low numbers of tryptase+ and chymase+ mast cells associated with reduced survival and advanced tumor stage in melanoma. Melanoma Res <u>25</u>, 479–485.

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, et al. (2012): Survival in BRAF V600–mutant advanced melanoma treated with Vemurafenib. N Engl J Med <u>366</u>, 707-714.

Starz H, Balda BR, Krämer KU, Büchels H, Wang H (2001): A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. Cancer <u>91</u>, 2110–2121.

Starz H, Siedlecki K, Balda BR (2004): Sentinel lymphonodectomy and S-classification: A successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma. Ann Surg Oncol <u>11</u>, 162-168.

Steinman RM (2003): The control of immunity and tolerance by dendritic cells. Pathol Biol (Paris) <u>51</u>, 59–60.

Stewart T, Tsai SC, Grayson H, Henderson R, Opelz G (1995): Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. Lancet <u>346</u>, 796–798.

Tang CH, Grimm EA (2004): Depletion of endogenous nitric oxide enhances Cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. J Biol Chem <u>279</u>, 288–298.

Taylor MW, Feng GS (1991): Relationship between Interferon-gamma, Indoleamine 2,3-Dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J <u>5</u>, 2516–2522.

Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS (2007): Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol <u>25</u>, 869–875.

Tedder TF, Engel P (1994): CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunol Today <u>15</u>, 450–454.

Teeling JL, Mackus WJM, Wiegman LJJM, van den Brakel JHN, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, et al. (2006): The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. J Immunol <u>177</u>, 362–371.

Tefany FJ, Barnetson RS, Halliday GM, McCarthy SW, McCarthy WH (1991): Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non-regressing malignant melanoma. J Invest Dermatol <u>97</u>, 197–202.

Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild A, Eggermont AMM (2009): Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. Ann Oncol <u>20</u>, 22-29.

Testori AAE, Blankenstein SA, van Akkooi ACJ (2019): Primary melanoma: from history to actual debates. Curr Oncol Rep <u>21</u>, 112.

Thomas WD, Smith MJ, Si Z, Hersey P (1996): Expression of the co-stimulatory molecule CD40 on melanoma cells. Int J Cancer <u>68</u>, 795–801.

Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, et al. (2011): Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: An analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on cancer melanoma staging database. J Clin Oncol <u>29</u>, 2199-2205.

Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, et al. (2014): Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving Nivolumab. J Clin Oncol 32, 1020-1030.

Schönbeck U, Libby P (2001): The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci 58, 4–43.

van Acker HH, Anguille S, Willemen Y, van den Bergh JM, Berneman ZN, Lion E, Smits EL, van Tendeloo VF (2016): Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells. J Hematol Oncol 2, 101.

van Kooten C, Banchereau J (1997): Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. Curr Opin Immunol <u>9</u>, 330–337.

van Kooten C, Banchereau J (2000): CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol <u>67</u>, 2–17.

van de Ven R, van den Hout MFCM, Lindenberg JJ, Sluijter BJR, van Leeuwen PAM, Lougheed SM, Meijer S, van den Tol MP, Scheper RJ, de Gruijl TD (2011): Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation. Blood <u>118</u>, 2502–2510.

van den Hove LE, Vandenberghe P, van Gool SW, Ceuppens JL, Demuynck H, Verhoef GEG, Boogaerts MA (1998): Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: Evidence for systemic activation of the T cell compartment. Leuk Res <u>22</u>, 175–184.

van der Ploeg APT, van Akkooi ACJ, Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Mitra A, Newton-Bishop JA, Cook M, van der Ploeg IMC, Nieweg OE, et al. (2011): Prognosis in patients with sentinel node–positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. J Clin Oncol <u>29</u>, 2206–2214.

Vanderslice P, Ballinger SM, Tam EK, Goldstein SM, Craik CS, Caughey GH (1990): Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. Proc Natl Acad Sci USA <u>87</u>, 3811–3815.

Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L (2004): Foxp3 expressing CD4+CD25high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. J Immunol <u>173</u>, 1444–1453.

Vujanovic L, Butterfield LH (2007): Melanoma cancer vaccines and anti-tumor T cell responses. J Cell Biochem <u>102</u>, 301–310.

Vuylsteke RJCLM, Borgstein PJ, van Leeuwen PAM, Gietema HA, Molenkamp BG, Muller MGS, van Diest PJ, van der Sijp JRM, Meijer S (2005): Sentinel lymph node tumor load: An independent predictor of additional lymph node involvement and survival in melanoma. Ann Surg Oncol 12, 440–448.

Weber A, Knop J, Maurer M (2003): Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. Br J Dermatol <u>148</u>, 224–228.

Whiteman DC, Green AC, Olsen CM (2016): The growing burden of invasive melanoma: Projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. J Invest Dermatol <u>136</u>, 1161–1171.

Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM (1996): A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. Br J Haematol <u>94</u>, 318–323.

Wood KL, Twigg HL, Doseff AI (2009): Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. Front Biosci (Landmark Ed) 14, 3771-3781.

Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA (1997): Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. Nature <u>387</u>, 527–530.

Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H (2018): Regulation of iNOS on immune cells and its role in deseases. Int J Mol Sci 19, 3805.

Yagi R, Zhu J, Paul WE (2011): An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. Int Immunol <u>23</u>, 415–420.

# Danksagung

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Philipp Ströbel für das Überlassen des Themas, die Hilfestellungen und Anregungen.

Ich möchte mich ebenfalls bedanken bei Herrn Prof. Dr. med. Lutz Kretschmer, der mir Forschungsmaterial aus seiner umfangreichen Sammlung überließ und mich bei deren Auswertung unterstützte.

Ein nachdrücklicher Dank gilt Herrn PD Dr. med. Felix Bremmer, der mich bei allen praktischen und theoretischen Fragestellungen unterstützte und mich unentwegt motivierte.

Ich danke der Abteilung für Pathologie der UMG, die das Forschungsvorhaben gewissenhaft vorantrieb und sich bei Fragen immer Zeit für mich nahm.